

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Utilisation und Metabolismus fertiger Pyrimidin-Desoxyribonukleoside: Untersuchungen mit ^3H -Desoxycytidin an HeLa-Zellen

Habilitationsschrift

ZUR

Erlangung der *venia legendi*
für Experimentelle Cytologie
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von

Dieter Müller

Marburg a. d. Lahn
1967

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Utilisation und Metabolismus fertiger Pyrimidin-Desoxyribonukleoside: Untersuchungen mit ^3H -Desoxycytidin an HeLa-Zellen

Habilitationsschrift

zur

Erlangung der venia legendi
für Experimentelle Cytologie
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn



vorgelegt von

Dieter Müller

Marburg a. d. Lahn
1967

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Untersuchungen mit 4-Hydroxyphenol
in Verbindung mit 4-Hydroxyphenol
in Verbindung mit 4-Hydroxyphenol



Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
B. <u>MATERIAL und METHODIK</u>	6
1. Zellkulturen	6
2. Durchführung der radioaktiven Versuche	7
3. Autoradiographie	8
a) Herstellung der Autoradiogramme	8
b) Auswertung der Autoradiogramme	9
4. Messungen mit dem Flüssigkeits-Scintillations-Zähler	10
a) Messung verbrannten Materials	10
b) Messung fixierten Zellmaterials	10
c) Bestimmung der 3-H-Aktivität in Chromatogrammen	11
5. Trennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte nach Anwendung der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie	11
a) Einengung des Mediums	11
b) Hochspannungselektrophorese	12
c) Papierchromatographie	12
6. Trennung der Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure der DNS	13
a) Extraktion der DNS	17
b) Enzymatischer Abbau der DNS	17
c) Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der beiden Pyrimidindesoxyribotide	17
7. Nuklease-Behandlung	18
C. <u>UNTERSUCHUNGEN</u>	
I. Die Utilisation der fertigen Pyrimidin-Desoxyribonukleoside Thymidin und Desoxycytidin für die Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure	19
II. Die Utilisation des Desoxycytidins für die Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure der DNS	24
1. Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß des Desoxycytidins auf die 3-H-Thymidin-Inkorporation von HeLa-Zellen	24
2. Autoradiographische Untersuchungen mit ³ H-Desoxycytidin verschiedener Markierungsformen sowie mit 3-H-Thymidin	27
a) Zur Verwendung von Desoxycytidin mit unterschiedlicher 3-H-Markierung	27
b) Durchführung des Versuches und Ergebnisse	28
c) Interpretation der Ergebnisse	30

3. Biochemische Untersuchungen zur Utilisation des 3-H-Desoxycytidins-(G) für die Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure	33
III. Untersuchungen zur Kinetik der Desoxycytidin-Inkorporation	34
1. Die Inkorporation des Desoxycytidins als Funktion der Zeit	34
2. Die Inkorporation des Desoxycytidins als Funktion der Konzentration	40
IV. Der Abbau der Pyrimidin-Desoxyribonukleoside Thymidin und Desoxycytidin durch HeLa-Zellen	42
1. Biochemische Untersuchungen zum Abbau des Thymidins	42
2. Biochemische Untersuchungen zum Abbau des Desoxycytidins	46
V. Untersuchungen zur Pool-Bildung nach ^3H -Thymidin- und 3-H-Desoxycytidin-Inkubation	52
VI. Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Synthese-Phase und der anderen Teilphasen des Generationszyklus von HeLa-Zellen	58
1. Der Generationszyklus und seine Teilphasen	58
2. Die Bestimmung der S-Phase und der anderen Teilphasen des Generationszyklus mit der "Prozent-markierter-Mitosen-Methode"	61
3. Die Bestimmung der Dauer der S-Phase durch Anwendung der Doppelmarkierungsmethode	66
VII. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes sowie des Trockengewichtes von HeLa-Zellen	68
1. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes	68
2. Bestimmung des Trockengewichtes der Kerne und der Gesamtzellen	70
VIII. Die Bestimmung des Verhältnisses der radioaktiven Zerfälle des Tritiums zur Silberkornzahl in den Autoradiogrammen	70
D. <u>DISKUSSION</u>	76
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	93
F. <u>LITERATUR</u>	96

A. EINLEITUNG

=====

Zur Untersuchung des Nukleinsäurestoffwechsels wurden in den letzten Jahrzehnten in zunehmendem Maße radioaktiv-markierte Vorläufer der Nukleinsäuren verwendet. Als ein besonderer Fortschritt muß es - insbesondere im Hinblick auf autoradiographische Untersuchungen - bezeichnet werden, daß in letzter Zeit auch mit Tritium markierte Vorläufer der Nukleinsäuren hergestellt werden konnten. ^3H -markierte Substanzen bieten wegen des günstigen autoradiographischen Auflösungsvermögens (CARO, 1964) die Möglichkeit einer genauen Lokalisation ihrer Einbauorte innerhalb der Zelle.

Mit radioaktiv-markierten Pyrimidinderivaten in Form der einfachen Basen oder auch der Pyrimidin-Ribonukleoside- und Desoxyribonukleoside wurden bisher mannigfaltige Einbauversuche durchgeführt und die Eignung dieser Substanzen als Vorläufer der Nukleinsäuren untersucht. Es stellte sich dabei heraus, daß gegenüber den Pyrimidin-Ribosiden und -Desoxyribosiden die entsprechenden Basen nicht oder aber nur in sehr geringem Maße für die Nukleinsäure-Synthese verwertet werden (DOMAGK, 1964).

So ergaben Untersuchungen mit ^{15}N -markiertem Uracil und Thymin (PLENTL und SCHOENHEIMER, 1944) sowie mit ^{15}N -markiertem Cytosin (BENDICH, GETLER und BROWN, 1950), daß diese Substanzen nicht in die Nukleinsäuren eingebaut werden. CANELLAKIS (1955) sowie LEIBMAN und HEIDELBERGER (1955) fanden dagegen später bei der Verwendung von ^{14}C -markiertem Uracil und Thymin eine - allerdings nur geringe - Utilisation dieser Basen. Tumorgewebe vermag Uracil allerdings in stärkerem Maße zu utilisieren als normales Gewebe (HEIDELBERGER, LEIBMAN, HARBERS und BHAGAVA, 1957). Offenbar wird im Tierversuch verabreichtes Uracil in der Leber rasch abgebaut (CANELLAKIS, 1955, 1956), so daß nur die Verabreichung großer Mengen zu einer meßbaren Utilisation führt (CANELLAKIS, 1957). RUTMAN, CANTAROW und PASCHKIS (1954) führten mit 2-Acetylaminofluoren eine Tumorbildung der Leber herbei. Hierdurch war die Fähigkeit der Leber, Uracil abzubauen, offensichtlich

eingeschränkt, was wiederum eine verstärkte Utilisation des Uracils im Gesamtorganismus zur Folge hatte.

Die Pyrimidinnukleoside Uridin und Cytidin werden im Vergleich zu den entsprechenden Basen stärker genutzt und daher für RNS-Markierungen bevorzugt. LORING und PIERCE fanden bereits 1944 bei *Neurospora* eine günstige Verwertung des Cytidins und Uridins. Spätere biochemische Untersuchungen zeigten, daß die Utilisationsrate des Uridins geringer ist als die des Cytidins (HAMMERSTEN et al. 1949, 1950). Auch autoradiographisch zeigte sich bei verschiedenen Organen der Maus und der Ratte, daß das Uridin in geringerem Maße als das Cytidin inkorporiert wird (SCHULTZE, OEHLERT und MAURER, 1961).

Die Verabreichung von Cytidin hat jedoch nicht nur eine Markierung der Cytosin- und Uracilanteile der RNS zur Folge, sondern auch der Cytosin- und Thyminanteile der DNS (HAMMERSTEN et al., 1949, 1950; SCHULMAN, 1961). Auch von pflanzlichen Zellen wird Cytidin nicht nur für die RNS, sondern auch für die DNS verwandt (WOODS und TAYLOR, 1959). OEHLERT (1961) untersuchte autoradiographisch ebenfalls den Einbau von ^3H -Cytidin in die RNS und DNS bei der Maus und fand bei längeren Versuchszeiten nach Ribonukleasebehandlung in den Geweben mit lebhafter Zellteilung, wie z.B. in Darm, Milz und Lymphknoten, eine deutliche Schwärzung. Die Verbreitung der Markierung entsprach jener nach ^3H -Thymidin-Applikation (SCHULTZE und OEHLERT, 1960). Auch hieraus geht hervor, daß das Cytidin ebenfalls in die DNS eingebaut wird.

Ebenso wird Tritium-markiertes Uridin (^3H -5-Uridin) in die DNS eingebaut. Das ergaben Untersuchungen von COMINGS (1966, a, b) an menschlichen Fibroblasten und Lymphozyten, wobei 9 % der ^3H -Aktivität in den DNS-synthetisierenden Zellen gefunden wurden. SCHULTZE, OEHLERT und MAURER (1961) behandelten Schnitte von Pankreas, Magen und Dünndarm von Mäusen und Ratten nach ^3H -Uridin- bzw. ^3H -Cytidin-Gaben mit RNase. Dabei konnten aus den Schnitten des Pankreas 90 % der ^3H -Aktivität, aus Schnitten von Magen und Dünndarm 70 - 80 % herausgelöst werden. Hier zeigten besonders die Zellkerne im Kryptengrund eine Markierung wie nach ^3H -Thymidingaben.

Das Verhältnis der Utilisation für die RNS und DNS der Organe hängt wesentlich von dem Grad ihrer Zellerneuerung ab. So ist z. B. die Feststellung von DAVIDSON (1953) verständlich, daß bei der Leber der RNS-Umsatz ca. 30-mal größer war als derjenige der DNS. Entsprechend müssen sich diese Verhältnisse zugunsten einer Utilisation für die DNS bei Organen mit einer hohen Quote der Zellerneuerung verschieben.

Von den beiden hier besonders interessierenden Pyrimidin-Desoxyribonukleosiden Thymidin (TdR) und Desoxycytidin (CdR) wurde bisher dem ersteren wesentlich mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Nach den Untersuchungen von AMANO, MESSIER und LEBLOND (1959) kann das TdR als spezifischer Vorläufer der DNS gelten. Seither wurde es als Indikator für den DNS-Stoffwechsel sowohl als ^{14}C -TdR als auch als ^3H -TdR benutzt. Im Mittelpunkt stand die Anwendung insbesondere des ^3H -TdR in Verbindung mit der autoradiographischen Technik zur Bestimmung der Dauer des Generationszyklus und seiner Teilphasen (QUASTLER und SHERMAN, 1959; PAINTER und DREW, 1959; KOBURG und MAURER, 1962; PILGRIM und MAURER, 1962 u.a.).

Ferner wurde auch der Stoffwechsel dieses Pyrimidindesoxyribonukleosids untersucht, z. B. an menschlichen Leukozyten (COOPER und MILTON, 1964; MARSH und PERRY, 1964 a, b), Mäusethymocyten (COOPER und MILTON, 1964), Ascites-Zellen (JAQUEZ, 1962; ZAJICEK, BERNSTEIN, ROSIN und GROSS, 1963) sowie an HeLa-Zellen (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966). Als Abbauprodukte des TdR fand man dabei Thymin, Dihydrothymin und β -Ureidoisobuttersäure; jedoch traten bei den verschiedenen untersuchten Objekten Dihydrothymin und β -Ureido-iso-buttersäure in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Bei HeLa-Zellen konnte Thymin als Hauptabbauprodukt neben der β -Ureido-iso-buttersäure nachgewiesen werden (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966).

Weitgehend unbekannt war bisher die prozentuale Beteiligung des TdR an der DNS-Synthese im Gesamtorganismus und von Einzelzellen. Diese Beziehungen konnten erst vor kurzem aufgeklärt werden (STEWART et al., 1965; LANG, PILGRIM und MAURER, 1966; LANG, MÜLLER und MAURER, 1967). So zeigten z.B. Untersuchungen an verschiedenen Zellarten der Maus eine in starkem Maße von der Konzentration des Vorläufers abhängige Utilisation für neugebildete DNS. Zugleich wurde hieraus deutlich, daß auch bei

Verabreichung großer TdR-Mengen die natürliche Synthese von Thymidylsäure nicht völlig unterdrückt werden kann (LANG, PILGRIM und MAURER, 1966).

Dem CdR wurde bisher, im Gegensatz zum TdR, nur sehr geringe Aufmerksamkeit geschenkt. Kombinierte biochemische und autoradiographische Untersuchungen befaßten sich nur mit dem Desoxycytidinmonophosphat (COOPER und MILTON, 1964). Biochemische Untersuchungen über den Abbau und die Utilisation des CdR erfolgten bisher im wesentlichen an Ratten (REICHARD und ESTBORN, 1951), ferner an Hepatoma-Zellen (SCHNEIDER und ROTHERHAM, 1961) und an Hühnerembryonalgewebe (siehe REICHARD, 1959; MALEY und MALEY, 1963).

Das CdR wird als Desoxycytidylsäure und als Thymidylsäure in die DNS eingebaut, wie man biochemischen Untersuchungen mit ¹⁵N-CdR bei Ratten (REICHARD und ESTBORN, 1951) und mit ¹⁴C-CdR an Hühner-Embryonalgewebe (REICHARD, 1959; MALEY und MALEY, 1962) entnehmen kann. Es ergaben sich jedoch Widersprüche hinsichtlich des Verhältnisses des für DNS-Cytosin und DNS-Thymin utilisierbaren CdR. Während REICHARD (1959) bei Hühner-Embryonal-Gewebe eine überwiegende Utilisation des CdR für das DNS-Cytosin fand, stellten MALEY und MALEY (1963) bei ihren Untersuchungen am gleichen Material fest, daß es ein besserer Vorläufer des DNS-Thymins als des DNS-Cytosins sei.

SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) wiesen bei Hepatoma-Zellen eine sehr rasche Umwandlung des CdR in Uridindesoxyribose (UdR) nach, die ein wichtiges Zwischenprodukt des Zellstoffwechsels darstellt. Nach ihrer Vorstellung ergibt sich eine Accumulation von UdR aus dem Reaktionsablauf CdR → dCMP → dUMP → UdR. Nach Ansicht von MALEY und MALEY (1963) kommt jedoch dem Reaktionsablauf mit vorangehender Desaminierung eine größere Bedeutung zu: CdR → UdR → dUMP.

Die sich teilweise widersprechenden Befunde wurden mit verschiedenen Methoden, mit unterschiedlicher Zielsetzung und an nicht vergleichbarem biologischem Material durchgeführt. Die bisherigen Aussagen über die Stoffwechselvorgänge sind lediglich qualitativer Natur. Es waren auch keine Untersuchungen speziell darauf gerichtet, festzustellen, in welchem Ausmaß das CdR für

die RNS utlilisiert wird. Es schien daher von besonderem Interesse, durch kombinierte autoradiographische und biochemische Untersuchungen eine Reihe von Fragen aufzuklären, die sich beim Studium der bisher vorliegenden Arbeiten ergaben. So sollten autoradiographische und biochemische Untersuchungen an HeLa-Zellen Aufschluß geben über den Inkorporationsmechanismus und die Abbauege des CdR, über seine Utilisation für die DNS und RNS und eine mögliche Pool-Bildung seiner Derivate. Ferner sollte das Verhältnis zwischen der Utilisation des CdR für die Nukleinsäuren und dem Abbau des Vorläufers ermittelt werden. Diese Befunde waren mit entsprechenden, bei Anwendung von ^3H -TdR an HeLa-Zellen gewonnenen, zu vergleichen. Voraussetzung für derartige Untersuchungen war die Bestimmung des DNS-Gehaltes der HeLa-Zellen sowie des Generationszyklus und seiner Teilphasen.

B. MATERIAL UND METHODIK

1. Zellkulturen

Sämtliche Untersuchungen erfolgten an HeLa-Zellen (Laborstamm MH 5). Der Zellstamm wurde in Roux-Flaschen gezüchtet und stets in einem 3- bis 4-Tage-Zyklus neu ausgesät. Die Ablösung des Zellrasens geschah mittels Trypsin (0,05%ige Lösung). Die ausgesäte Zellkonzentration betrug dabei 5,0 bis $6,5 \times 10^4$ Zellen pro ml, wobei in eine Rouxflasche 100 ml Zellsuspension eingebracht wurden. Die Zellkulturen wurden bei einer Temperatur von $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ gehalten.

Für die autoradiographischen Untersuchungen wurden Deckglaskulturen in "Leighton-Röhrchen" angelegt. Die Deckgläser hatten eine Größe von 10 x 30 mm. Die Leighton-Röhrchen wurden beschickt mit 1,5 ml Zellsuspension. Im allgemeinen betrug die Zellkonzentration 2×10^5 Zellen pro ml. (Sofern in einzelnen Fällen die Zellkonzentration oder andere Bedingungen geändert wurden, wird das bei der Beschreibung des Versuchs besonders vermerkt.) Die radioaktiven Versuche fanden im allgemeinen am Tag nach der Aussaat der Zellen statt. Zu diesem Zeitpunkt war auf den Deckgläschen ein noch nicht geschlossener Zellrasen vorhanden.

Für die Zellkulturen und die Durchführung der radioaktiven Versuche wurden insgesamt drei Medien verschiedener Zusammensetzung verwendet, deren Grundlage EAGLEs-Basal-Medium war. Die Zusammensetzung der Medien ist in der folgenden Tabelle angegeben:

	Anzüchtungs- Medium (ml)	Fütterungs- Medium (ml)	Versuchs- Medium (ml)
EAGLEs-Basal-Medium	9	9	10
Lactalbuminhydro- lysat-Lösung	10	10	-
Natriumbicarbonat- lösung	4	12	12
Penicillin-Strepto- mycin-Lösung	1	1	1
Wasser (quarz-destill.)	76	68	77
Kälberserum	10	10	-

Lactalbuminhydrolysat-Lösung: 5%ige Lösung von Lactalbuminhydrolysat (DIFCO, Detroit, Michigan),
Natriumbicarbonatlösung: 1,4%ige Lösung mit Zusatz von Phenolrot (0,4mg ad 100 ml Wasser).

Die Penicillin-Streptomycinlösung wurde so eingestellt, daß in 1 ml fertigen Mediums 100 E Penicillin und 100 μ g Streptomycin enthalten waren.

Das "Anzüchtungsmedium" wurde zum Ansatz der Kulturen in Roux-Flaschen oder "Leighton-Röhrchen" verwendet. Das "Fütterungsmedium" wurde gebraucht zur Erneuerung des Mediums zwei Tage nach dem Ansatz der Zellen (Roux-Flaschen) oder auch zur Durchführung radioaktiver Versuche, wenn die Zellen nach der Inkubation des radioaktiven Vorläufers noch über einen längeren Zeitraum (mehr als acht Stunden) gehalten werden mußten. Das "Versuchsmedium", das sich von den bisher genannten Kulturflüssigkeiten dadurch unterschied, daß es kein Lactalbuminhydrolysat und Kälberserum enthielt, wurde für alle radioaktiven Versuche verwendet, die im allgemeinen über eine Versuchszeit von 60 Minuten liefen.

2. Durchführung der radioaktiven Versuche

Für die radioaktiven Versuche wurden verwendet: ^3H -Desoxycytidin-(5-T) (The Radiochemical Centre, Amersham, England, spezifische Aktivität 8.300 mC/mMol), ^3H -Desoxycytidin-(G) (New England Nuclear Corporation, Boston, Mass., spezifische Aktivität 991 mC bzw. 519 mC/mMol), ^3H -Thymidin-(methyl-T) (The Radiochemical Centre, Amersham, England, spezifische Aktivität 13000 mC/mMol).

Die verwendeten radioaktiven Substanzen wurden jeweils nach Erhalt in Versuchsmedium verdünnt. Von diesen so hergestellten, bei -20°C aufbewahrten Stammlösungen wurde der radioaktiv markierte Vorläufer für mehrere Versuche verwendet.

In einigen Versuchen mußte zur Erreichung höherer Thymidin- oder Desoxycytidin-Konzentrationen der ^3H -markierte Vorläufer durch Zugabe des inaktiven Vorläufers verdünnt und somit die

spezifische Aktivität verringert werden. Hierzu wurden Thymidin oder Desoxycytidin ("SIGMA"-Chemical-Company, St. Louis, Missouri) verwendet, die in Verdünnungsreihen aus einer Stammlösung vorlagen. Diese Lösungen des inaktiven Vorläufers in "Versuchsmedium" wurden gleichfalls bei -20°C gehalten.

Zu Beginn jedes Einbauversuches wurden die Zellkulturen nach Abgießen des Mediums vorsichtig mit "Hanks Basal Salt Solution" (BSS) gewaschen. Sofort anschließend wurde das den aktiven Vorläufer enthaltende Medium in die Kulturgefäße eingebracht. Die für "Leighton"-Röhrchen verwendete Menge betrug im allgemeinen 1,0 ml. Nach Ablauf der radioaktiven Versuchszeit erfolgte nach Absaugen der Kulturflüssigkeit eine Spülung mit BSS und anschließend die Fixierung mit CARNOYscher Flüssigkeit (6 Teile Äthanol, 3 Teile Chloroform, 1 Teil Eisessig) für etwa 15 Minuten. In einigen Versuchen wurden die Zellen nach der Beendigung der radioaktiven Versuchszeit noch in inaktivem Medium belassen, wobei in Einzelfällen eine mehrmalige vorsichtige Spülung mit BSS erfolgte. (Auf andere Einzelheiten wird besonders hingewiesen.) Alle Medien, Spüllösungen etc. hatten während der Versuche eine Temperatur von $37,0$ bis $37,5^{\circ}\text{C}$. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen in einem begasten ($5\% \text{CO}_2$) Brutschrank bei 37°C gehalten.

3. Autoradiographie

a) Herstellung der Autoradiogramme:

Nach beendeter Fixierung und Trocknung der Präparate wurden die Deckgläser mit "Eukitt" auf Objektträger aufgeklebt. Nach zweitägiger Trocknung erfolgten die Reinigung der Präparate mit Xylol und ihre Weiterbehandlung in der absteigenden Alkoholreihe. Zur Entfernung säurelöslicher, nicht in die DNS oder RNS eingebauter Anteile des radioaktiv markierten Vorläufers wurden die Präparate dem folgenden Waschprozeß unterworfen: 1 Stunde 5%ige Trichloressigsäure bei 20°C , 1/2 Stunde fließendes Leitungswasser, 3 Stunden 0,05%ige Lösung des inaktiven Vorläufers bei 20°C , 1 Stunde fließendes Leitungswasser.

Zur Herstellung der Autoradiogramme wurden "stripping film AR 10" sowie ein sog. "unsupported stripping film", Experimental Scientific Plates V 1062 (KODAK, London), verwendet. Am Tag vor dem Auflegen des Filmes wurden die Präparate bei 37°C für ca. 10 Sekunden in Chromalaun-Gelatine getaucht (0,6 g Gelatine und 0,05 g Kaliumchrom(III)-sulfat ad 100 ml Wasser). Die Exposition erfolgte bei 4°C in trockener Luft. Die Expositionszeit betrug im allgemeinen 2 - 14 Tage, in einigen Fällen bis zu 34 Tage. Der Entwicklungsprozeß dauerte genau 4 Minuten bei einer Entwicklertemperatur von 20° ± 0,2°C. Anschließend erfolgten die Fixierung (15 Minuten) sowie die fließende Wässerung (30 Minuten). Die Nachfärbung geschah mit Haematoxylin nach BÖHMER und mit Eosin, bei einer vorangegangenen DNase-Behandlung mit Toluidinblau. In diesem Fall fand der "unsupported stripping film" Verwendung, der den Vorteil hat, daß er bei einer nachfolgenden Toluidinblaufärbung keine Niederschläge aufnimmt.

b) Auswertung der Autoradiogramme:

Für jeden Meßpunkt erfolgte eine Auswertung von 5 Präparaten mit einem Ölimmersionsobjektiv 100 x. Bestimmt wurde die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) durch Auszählung von jeweils mindestens 1000 Silberkörnern in einem Präparat. Die mittlere Silberkornzahl der Autoradiogramme lag im allgemeinen zwischen 25 und 35 pro markiertem Kern. Für die Auszählung wurde ein in 20 x 20 Felder eingeteiltes Planquadrat benutzt, das bei der verwendeten Optik eine Fläche von 80 x 80 µ begrenzte. Der Nulleffekt war gering und wurde berücksichtigt. Nach der Bestimmung der SkZ/mK erfolgte deren Umrechnung auf eine Expositionszeit von einem Tag.

Zur Ermittlung des ³H-Index (= Prozentsatz der DNS-synthetisierenden Kerne, bezogen auf alle ausgezählten Kerne) wurden in jedem Präparat mindestens 1000 Zellen ausgezählt.

Der Bestimmung des Mitose-Index lagen jeweils mindestens 5000 Zellen/Präparat zugrunde. Zur Ermittlung des Prozentsatzes markierter Mitosen wurden pro Präparat 500 Mitosen (markiert und nicht markiert) ausgezählt.

4. Messungen mit dem Flüssigkeits-Scintillations-Zähler

Die Messungen wurden mit dem Flüssigkeitsscintillations-Spektrometer Modell 6860, "MARK I", der Firma "Nuclear Chicago" vorgenommen. Quenchkorrekturen erfolgten durch die kombinierte Anwendung der Kanalverhältnismethode und externer Standardisierung (Barium 133).

a) Messung verbrannten Materials:

Nicht im Scintillationsmedium direkt lösliches Material, z. B. Zellen oder auch DNS-Lösung, wurden in Filtrierpapier verpackt oder auf dieses aufgetropft und nachfolgend verascht. Die Verbrennung des in Platinnetzen eingeklemmten Materials geschah in Sauerstoffatmosphäre in gekühlten 2-Liter-Erlenmeyer-Kolben. Die Verbrennungsrückstände wurden nachfolgend durch kräftiges Schütteln in Scintillationsflüssigkeit aufgenommen (Zusammensetzung: POPOP = 0,52 g, PPO = 20,0 g, Toluol = 2,0 L, absoluter Alkohol = 1,260 L).

b) Messung fixierten Zellmaterials:

Zur Bestimmung relativer Größen der in Zellen eingebauten ^3H -Aktivität wurde folgendes Verfahren entwickelt: Die für die Flüssigkeitsscintillations-Messungen verwendeten Probenfläschchen wurden einem speziellen Reinigungsverfahren für Zellkulturgefäße unterworfen und sterilisiert. In diese Probenfläschchen kamen gleiche Volumina einer homogenen Zellsuspension. Vergleichende Messungen haben identische Zellmengen in den Küvetten zur Voraussetzung. Meist am 1. Tage nach der Aussaat der Zellen wurden diese (nachdem sich ein gleichmäßiger, nicht geschlossener Zellrasen entwickelt hatte) in Medien inkubiert, die ^3H -markierte Vorläufer enthielten. Nach beendeter radioaktiver Versuchszeit erfolgte die Fixierung des Zellrasens und die weitere Präparation in der für die Herstellung der Autoradiogramme (B 3a) beschriebenen Weise. Danach geschah die Einfüllung der Scintillationsflüssigkeit auf den fixierten und getrockneten Zellrasen und die direkte Messung im Flüssigkeitsscintillations-Zähler. Hierbei wurden keine absoluten Bestimmungen der ^3H -Aktivität angestrebt, sondern lediglich relative

Größen zwischen zwei Meßpunkten bestimmt. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse wurden daher als "cpm/Küvette" angegeben. (Zusammensetzung der Scintillationsflüssigkeit siehe bei 4 c). Nach mehrwöchiger Einwirkung der Scintillationsflüssigkeit konnte keine Veränderung der Meßergebnisse gefunden werden.

c) Bestimmung der ^3H -Aktivität in Chromatogrammen:

Zur relativen Bestimmung der ^3H -Aktivität in den Abbauprodukten des Desoxycytidins und Thymidins, deren Trennung durch die kombinierte Anwendung der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie erfolgte (siehe B 5), wurde das die Flecken enthaltende Chromatographie-Papier direkt gemessen. Nach der Identifizierung der Flecken in den getrockneten Chromatogrammen wurden diese in 2 x 2 cm große Quadrate aufgeteilt und diese einzeln flach auf den Boden der Probenfläschchen gelegt, wodurch stets gleiche geometrische Verhältnisse gewährleistet waren. Nach Einfüllung der Scintillationsflüssigkeit (PPO = 6,0 g, POPOP = 0,10 g, Toluol = 1,0 L) erfolgte anschließend die Messung im Flüssigkeitsscintillations-Zähler. Kontrollen ergaben keine Veränderungen der Zählergebnisse nach mehrwöchiger Aufbewahrung der Proben.

5. Trennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte nach Anwendung der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie

a) Einengung des Mediums:

Von den jeweils abpipettierten aliquoten Teilen des Mediums wurden 2,0 ml zur Auftrennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte entnommen und in spitze 25-ml-Kölbchen eines Rotationsverdampfers eingebracht. Zu diesen 2,0 ml wurden jeweils 0,75 ml einer wäßrigen Lösung der den Abbauprodukten identischen, nicht radioaktiv-markierten Substanzen hinzugefügt. Jedes dieser nicht markierten Stoffe war in einer Menge von 200 μg in diesen 0,75 ml enthalten. Diese zur Identifizierung verwendeten Substanzen stammten von "SIGMA"-Chemical-Company, St. Louis, Mo., U.S.A., sowie von "SERVA"-Entwicklungslabor, Heidelberg. Das Gesamtvolumen wurde bei einer Wassertemperatur

von 50°C eingedampft und der Rückstand in 0,50 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Von diesem Volumen wurden 0,025 ml mit einer "AGLA"-Mikrometer-Spritze (Burroughs Wellcome & Co., London) auf das Papier für die Hochspannungselektrophorese aufgetragen.

b) Hochspannungselektrophorese:

Hierfür wurde das gleichfalls für die nachfolgende Papierchromatographie geeignete Papier "2214 ff", MACHERY & NAGEL, Düren/Rhld., in einer Größe von 560 x 287 mm verwandt. Die Auftragsstelle lag 20 cm vom rechten Blattrand (Anode) und 3 cm vom unteren Blattrand entfernt (siehe Abb. 1a). Pufferlösung: Essigsäure-Natriumacetat-Puffer nach WALPOLE, 0,6 molar, pH 3,6, Temperatur: -2°C, angelegte Spannung: 2,4 kV, Laufzeit ca. 1 h 20'. Danach erfolgten die Trocknung des Elektropherogramms bei 100°C im Trockenschrank und die Identifizierung der Flecken mittels UV-Licht (254 μ). Dabei ergab sich die in der Abb. 1a dargestellte Situation: In Richtung auf die Kathode waren das Cytosin, welches sich nach diesem Vorgang als einzige Substanz isoliert vorfand, ferner das CdR und das BAIB, gewandert, die nicht voneinander getrennt waren. Im Bereich des Auftragspunktes (AP) lagen T, TdR, U, UdR und dCMP. Aus den Ergebnissen von Vorversuchen, bei denen die nicht radioaktiv markierten Stoffe einzeln aufgetragen worden waren, ging hervor, daß sich die hier noch gemeinsam im Bereich des Auftragspunktes liegenden Substanzen nur geringfügig in Richtung auf die Anode (dCMP) und auf die Kathode (T, TdR, U, UdR) bewegten. In Richtung auf die Anode waren TMP und dUMP gewandert, die ebenfalls noch keine Trennung voneinander zeigten. Deshalb wurde eine weitere Auftrennung erforderlich, die durch Anwendung der Papierchromatographie erfolgte.

c) Papierchromatographie:

Das in Abb. 1a dargestellte Elektropherogramm wurde zunächst durch einen senkrecht verlaufenden Schnitt, 3 cm rechts vom Auftragspunkt (Schnitt I in Abb. 1a), in zwei Teile (A und B)

Abkürzungen siehe bei Abb. 1a.

geteilt.

Die im Teil A enthaltenen Substanzen C, CdR, BAIB, T, TdR, U, UdR und dCMP wurden mittels aufsteigender Papierchromatographie getrennt. Laufmittel: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 10 : 30, v/v (obere Phase) (COOPER und MILTON, 1964). Nach der Trocknung zeigte sich bei Betrachtung unter der UV-Lampe und nach Sichtbarmachung des BAIB durch eine Farb-reaktion (Ninhydrin) die in der Abb. 1b dargestellte Situation: Sämtliche Substanzen waren voneinander getrennt mit Ausnahme des U und des TdR, deren weitere Auftrennung erforderlich war.

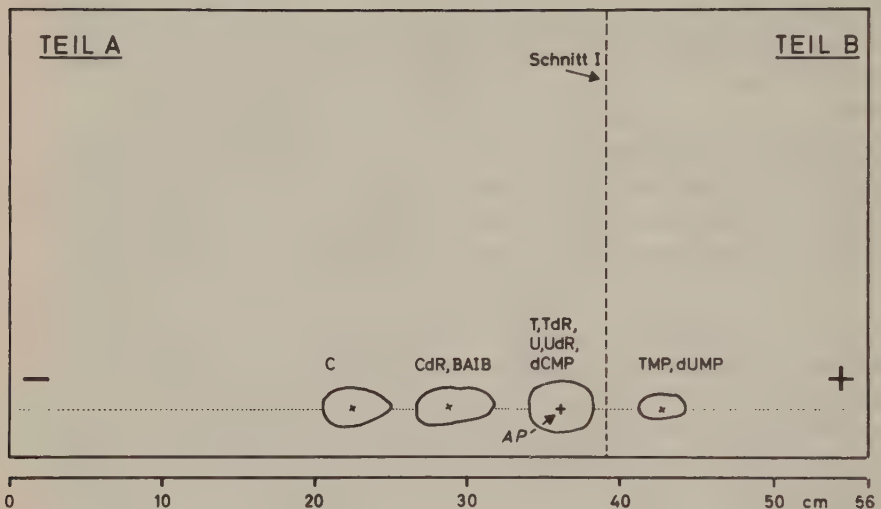
Wie aus der Abb. 1b ersichtlich, wurde deshalb aus dem eben beschriebenen Chromatogramm ein Teil herausgeschnitten (Schnitt II, Teil C in Abb. 1b). Diese beiden Substanzen sind dann gleichfalls in aufsteigender Chromatographie entwickelt worden. Lösungsmittel: Butanol-(1), wassergesättigt. Auf diese Weise konnten U und TdR einwandfrei getrennt werden (siehe Abb. 1c).

Die im Teil B enthaltenen Substanzen TMP und dUMP wurden gleichfalls durch aufsteigende Chromatographie getrennt. Lösungsmittel: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 13 : 27, v/v (obere Phase) (variiert nach COOPER und MILTON, 1964) (siehe Abb. 1d).

Durch Flüssigkeitsscintillations-Messungen (siehe B 4c) wurde der prozentuale Anteil der Aktivität des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte bestimmt.

6. Trennung der Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure der DNS

Diese Untersuchungen hatten zum Ziel festzustellen, zu welchen prozentualen Anteilen ^3H -CdR-(G) für die Desoxycytidylsäure und die Thymidylsäure der DNS utlilisiert wird. Hierzu waren erforderlich: a) die Extraktion der DNS aus Zellmaterial nach ^3H -CdR-Inkubation, b) die enzymatische Hydrolyse der DNS und c) die hochspannungselektrophoretische Auftrennung der Pyrimidin-desoxyribotide.



Abbildungen 1a-d:

Trennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte mit Hilfe der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie.

Abb. 1a:

Hochspannungselektrophorese: Papier: Machery und Nagel 2214 ff, 560 x 287 mm, Puffer: Essigsäure-Natriumacetat-Puffer nach WALPOLE, 0,6 m, pH 3,6, Spannung: 2,4 kV, Temperatur: -2°C, Laufzeit 1 h 20' (AP = Auftragspunkt).

Ergebnis: Im Elektropherogramm liegen auf der Kathodenseite getrennt das Cytosin sowie gemeinsam CdR und BAIB, auf der Anodenseite gemeinsam das TMP und das dCMP. Im Bereich der Auftragsstelle sind noch nicht voneinander zu trennen T, TdR, U, UdR, dCMP.

Abkürzungen: CdR = Desoxycytidin, dCMP = Desoxycytidin-5'-monophosphat, C = Cytosin, TdR = Thymidin, TMP = Thymidin-5'-monophosphat, T = Thymin, UdR = Uridindesoxyribose, dUMP = Desoxyuridin-5'-monophosphat, U = Uracil, BAIB = β -Amino-iso-buttersäure.

(Aus: MÜLLER, D. und R. RATHENBERG, 1967, unveröffentlicht)

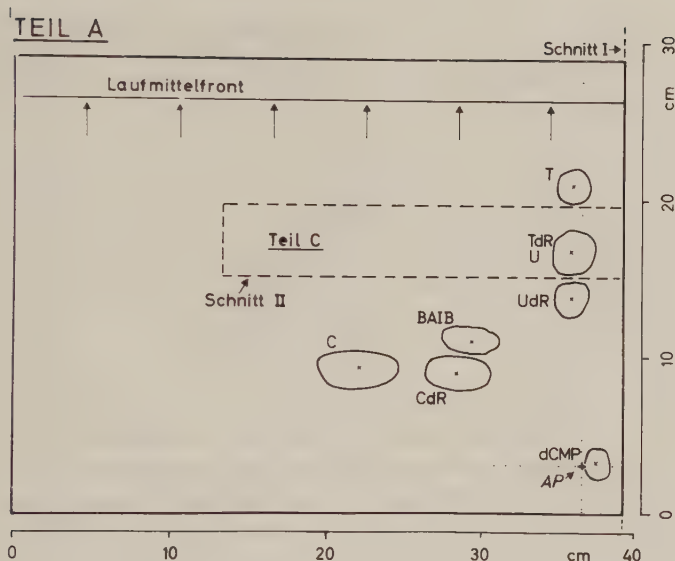


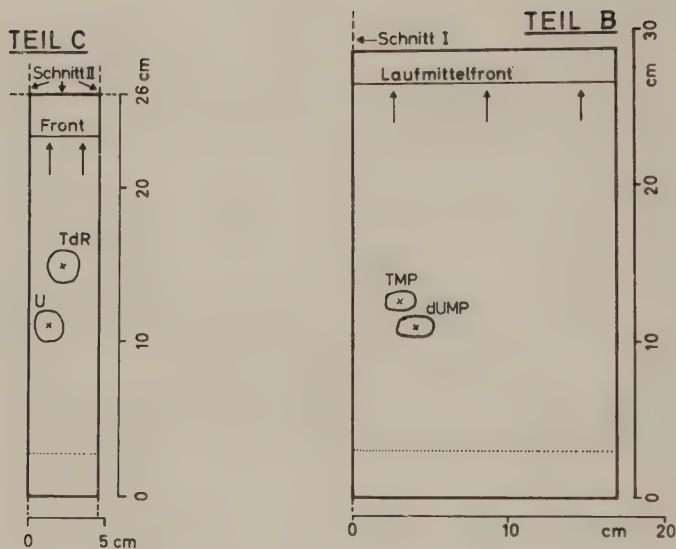
Abb. 1b:

Papierchromatographie: Teil A (nach Schnitt I) des Elektropherogramms (siehe Abb. 1a). Laufmittel: Essigsäureäthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 10 : 30, v/v (obere Phase).

Ergebnis: Trennung von BAIB und CdR sowie der im Bereich des Auftragspunktes des Elektropherogramms noch nicht zu unterscheidenden Abbauprodukte T, TdR, U, UdR und dCMP. Nach der Chromatographie sind lediglich TdR und U noch nicht voneinander getrennt.

(Nach dieser Auftrennung zeigte sich, daß die im Elektropherogramm noch im Bereich des Auftragspunktes (AP) gelegenen Substanzen bereits gewandert waren. Siehe Positionen neben der senkrechten punktierten Linie über dem AP. Auf der Kathodenseite liegen T, TdR, U und UdR, auf der Anodenseite dCMP).

(Aus: MÜLLER, D. und R. RATHENBERG, 1967, unveröffentlicht)



c)

d)

Abb. 1c:

Papierchromatographie: Trennung der im Teil C (nach Schnitt II aus Teil A) (siehe Abb. 1b) gelegenen Abbauprodukte TdR und U. Laufmittel: Butanol, wassergesättigt.

Abb. 1d:

Papierchromatographie: Trennung der im Teil B (nach Schnitt I) gelegenen Abbauprodukte TMP und dUMP. Laufmittel: Essigsäure-äthylester : Ameisensäure : Wasser = 60 : 13 : 27, v/v (obere Phase).

(Aus: MÜLLER, D. und R. RATHENBERG, 1967, unveröffentlicht)

a) Extraktion der DNS:

Diese erfolgte nach der Homogenisierung der Zellen durch Anwendung von Ultraschall nach der von SCHNEIDER (1945) angegebenen Methode (siehe auch DOMAGK, 1964).

b) Enzymatischer Abbau der DNS:

Dieser wurde in zwei Schritten vollzogen, nämlich zunächst durch DNase- und nachfolgend durch Phosphodiesterase-Behandlung (COHN, 1957; siehe auch DOMAGK, 1964).

aa) DNase-Behandlung: Das Ausgangsvolumen betrug jeweils ca. 15 ml. Dieses enthielt 0,03 % DNS, 0,03 % DNase (Desoxyribonuklease I krist. reinst, 90.000 dornase-E/mg, SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg) sowie 0,04 m Mg^{++} . Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Autotitrator (Typ TTT 1c, "Radiometer", Kopenhagen) bei einem pH von 7,4.

bb) Phosphodiesterase-Behandlung: Nach beendeter DNase-Behandlung (ca. 2 h) wurde der pH 8,4 durch Zugabe von ca. 15 ml 1/100 n NaOH eingestellt und Phosphodiesterase hinzugefügt. Die Konzentration betrug ca. 2,4 mg/ml. Die Phosphodiesterase wurde aus Schlangengift (SERVA, Entwicklungslabor, Heidelberg) durch Säulenchromatographie mit Cellulosepulver (MN 2100, MACHERY und NAGEL, Düren/Rhld.) (HEIDELBERGER et al., 1956; HURST und BUTLER, 1951) gewonnen und das gereinigte Material gefriergetrocknet aufbewahrt.

c) Hochspannungselektrophoretische Auftrennung der beiden Pyrimidindesoxyribotide:

Das nach der enzymatischen DNS-Hydrolyse erhaltene Gesamtvolumen ist im Rotationsverdampfer bei 50°C auf etwa 5 ml eingeeengt worden. Hiervon wurden etwa 0,05 ml für die Hochspannungselektrophorese aufgetragen und an der Auftragungsstelle nicht radioaktivmarkierte Vergleichssubstanzen (TMP und dCMP) in einer Menge von jeweils ca. 10 µg in Lösung hinzugefügt. Die Auftrennung und Identifizierung erfolgten unter den gleichen Bedingungen wie bei der oben beschriebenen Auftrennung des Desoxycytidins und seiner Abbauprodukte (siehe B 5c). Durch Messung im Flüssigkeitsscintillations-Zähler wurden die prozentualen Anteile der 3H -Aktivität des TMP und des dCMP bestimmt.

7. Nuklease-Behandlung

In einigen Fällen wurde vor der Herstellung der Autoradiogramme bzw. vor der Messung der ^3H -Aktivität des am Boden der Probefläschchen fixierten Zellrasens eine DNase- oder RNase-Behandlung durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in beiden Fällen bei einer Temperatur von 37°C und dauerte 20 Stunden. Desoxyribonuklease (Serva, kristallisiert, reinst) wurde angewandt in 0,2 M Trismaleat-Puffer (GOMORI, 1948) mit 0,2 M Konzentration von Magnesium-Ionen, pH 7,0 (4500 Dornase-E/ml Pufferlösung), die Ribonuklease (SERVA, RNase A) in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,3 (5mg/100ml Pufferlösung). Anschließend wurden die Präparate nochmals gewaschen (20 Minuten 5%ige Trichlor-essigsäurelösung, 20 Minuten fließendes Wasser).

C. U N T E R S U C H U N G E N

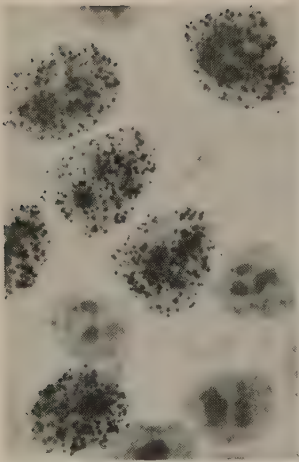
I. Die Utilisation der fertigen Pyrimidin-Desoxyribonukleoside

Thymidin und Desoxycytidin für die Desoxyribonukleinsäure und Ribonukleinsäure

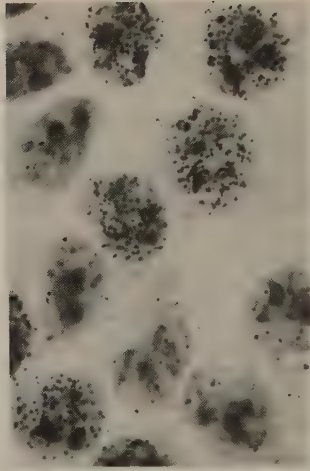
In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse dargelegt werden, die bei Markierung mit ^3H -Desoxycytidin-(5-T) nach der Behandlung mit DNase gewonnen wurden (MÜLLER, 1966).

Es wurden parallel autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-TdR und mit 3-H-CdR-(5-T) durchgeführt. In der üblichen Weise in Leighton-Röhrchen gezüchtete HeLa-Zellen waren am Tag nach der Aussaat in einem Medium inkubiert worden, das 3-H-CdR-(5-T) bzw. 3-H-TdR-(methyl) enthielt. Die Inkubation dauerte 60 Minuten. Im einen Fall enthielt das Medium 0,2 μC 3-H-TdR/ml, dessen spezifische Aktivität durch Zusatz von inaktivem TdR auf 500 mC/mMol eingestellt worden war. Im anderen Fall wurden 2,0 μC 3-H-CdR-(5-T)/ml verwandt, dessen spezifische Aktivität 5.000 mC/mMol betrug. Somit lagen bei beiden Nukleosiden äquimolare Konzentrationen vor (TdR 0,0969 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CdR 0,0909 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ein Teil der Präparate wurde mit DNase behandelt und eine gleiche Anzahl von Präparaten in Pufferlösung ohne Zusatz von DNase eingestellt.

Eine Gegenüberstellung der Verhältnisse nach der Inkubation mit ^3H -TdR einerseits und ^3H -CdR andererseits ist am besten möglich an Präparaten mit einer hohen Silberkorndichte (Expositionszeit 10 d). Nach der ^3H -TdR-Inkubation betrug der " ^3H -Index" (= Prozentsatz DNS-synthetisierender Kerne, bezogen auf alle gezählten Kerne) etwa 48 %, wobei die Kerne durch dicht liegende Silberkörner markiert waren (Abb. 2a). Die übrigen 52 % der Kerne wiesen keine Markierung auf. Nach der ^3H -CdR-Inkubation war ein etwa gleich großer Prozentsatz (etwa 47 %) "stark" durch dicht liegende Silberkörner markiert (Abb. 2b), jedoch wiesen auch fast alle übrigen Kerne (ca. 52 %) eine - allerdings "schwache" - Markierung auf. Auch über dem Cytoplasma waren hier vereinzelte Silberkörner vorhanden. Nach der DNase-Behandlung stellten sich die Verhältnisse in folgender Weise dar: Bei den ^3H -TdR-Präparaten zeigten noch über 40 % der Kerne lediglich einzeln



a)



b)

Abb. 2a: Autoradiogramm von HeLa-Zellen, Haematoxylin-Eosin-Färbung, 1200 x. - ^3H -Thymidin-Inkubation. Über einem Teil der Zellkerne "starke" Markierung durch dicht liegende Silberkörner. Die anderen Zellkerne weisen keine Markierung auf.

Abb. 2b: Autoradiogramm wie in Abb. 2a - ^3H -Desoxycytidin-Inkubation. Über einem Teil der Zellkerne "starke" Markierung durch dicht liegende Silberkörner; über den anderen Kernen nur eine "schwache" Markierung durch einzeln liegende Silberkörner. Auch über dem Cytoplasma sind vereinzelte Silberkörner sichtbar.

Aus: MÜLLER, D.(1966c)

liegende Silberkörner. Ebenso war auch bei den ^3H -CdR-Präparaten keine "starke" Markierung mehr sichtbar; hier fanden sich jeweils nur wenige Silberkörner über 91,4 % der Kerne. Die Autoradiogramme der nur mit Puffer behandelten Präparate zeigten gegenüber unbehandelten keine wahrnehmbaren Unterschiede.

Durch Auszählung der Silberkörner in Autoradiogrammen mit unterschiedlicher Expositionszeit wurde die mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern (SkZ/mK) ermittelt, bei ^3H -CdR-Präparaten getrennt nach "stark" und "schwach" markierten Kernen. Diese Bestimmung erfolgte an unbehandelten sowie an den mit DNase behandelten Präparaten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Aus den parallel durchgeführten autoradiographischen Untersuchungen mit ^3H -TdR und mit ^3H -CdR-(5-T) ohne und nach DNase-Behandlung ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

Nach ^3H -TdR-Inkubation wiesen 47,8 % der Kerne eine Markierung auf, d.h. der ^3H -Index (Prozentsatz der DNS synthetisierenden Zellen) betrug 47,8 %. Dagegen war über den anderen Kernen keinerlei Markierung sichtbar. Nach der ^3H -CdR-Inkubation wurde über 46,9 % der Kerne eine "starke" Markierung gefunden, 51,5 % der Kerne wiesen eine "schwache" Markierung auf, die übrigen 1,5 % waren nicht markiert. Die "starke" Markierung (46,9 %) wird zurückgeführt auf die vorwiegend in die DNS eingebaute ^3H -Aktivität; sie wäre demnach mit dem ^3H -Index identisch.

Aus dem Prozentsatz sowie der SkZ/mK "stark" und "schwach" markierter Kerne wurde das Verhältnis der Utilisation von ^3H -CdR-(5-T) für die DNA und RNA berechnet. Dabei wurde vorausgesetzt, daß auch die in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne RNS synthetisieren (BASERGA, 1962). Somit würden die Silberkörner bei den "stark" markierten Kernen zwar vorwiegend durch die in die DNS eingebaute, zum geringen Teil aber auch durch die in die RNS eingebaute ^3H -Aktivität hervorgerufen. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß bei Verwendung von ^3H -CdR-(5-T) lediglich die Desoxycytidylsäure, jedoch nicht die Thymidylsäure ^3H -markiert vorliegt, da das in Stellung 5 im Pyrimidinring angeordnete Tritium infolge des Methylierungsprozesses ausgetauscht

wird. Bei der ^3H -DNS-Aktivität handelt es sich also bei Verwendung von ^3H -CdR-(5-T) nur um " ^3H -Desoxycytidylsäure-Aktivität".

Nach den Berechnungen waren etwa 92,5 % der Silberkörner über allen Kernen auf die in die DNA und 7,5 % auf die in die RNA eingebaute ^3H -Aktivität zurückzuführen.

Eine weitere Möglichkeit der Berechnung der für die DNS und für die RNS utilisierten ^3H -CdR-Aktivität ergibt sich aus der Gegenüberstellung der Ergebnisse ohne und nach DNase-Behandlung. Die mittlere Silberkornzahl über allen Kernen betrug bei nicht mit DNase behandelten Präparaten 8,25, nach der DNase-Behandlung dagegen nur 0,48. Somit verblieben nach der DNase-Behandlung etwa 5,8 % ^3H -Aktivität.

Es lagen demnach über den Anteil der ^3H -RNS-Aktivität nach ^3H -CdR-(5-T) zwei verschiedene Untersuchungsergebnisse vor:

Bei Berechnungen aus dem Prozentsatz und der SkZ/mK "stark" und "schwach" markierter Kerne betrug der Anteil der ^3H -RNS-Aktivität 7,5 %,

bei Errechnung aus der mittleren Silberkornzahl über allen Kernen ohne und nach der DNase-Behandlung 5,8 %.

Bei der Verwertung dieser Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen nach der DNase-Behandlung 0,53 betrug. Diese SkZ/mK liegt demnach niedriger als die SkZ/mK über den "schwach" markierten Kernen unbehandelter Präparate, bei denen zweifellos ausschließlich eine RNS-Synthese im Gange war. Andererseits war der Prozentsatz markierter Kerne nach der DNase-Behandlung auf 91,4 gegenüber 98,4 bei unbehandelten Präparaten ("stark" und "schwach" markierte Kerne zusammengefaßt) abgesunken. Es liegt daher die Annahme nahe, daß auch ein Teil der ^3H -RNS-Aktivität aus den Kernen durch die DNase-Einwirkung herausgelöst wurde.

TABELLE I. Prozentsatz der „stark“ und der „schwach“ markierten Kerne, bezogen auf alle ausgezählten Kerne sowie die mittleren Silberkornzahlen über den markierten Kernen (SkZ/mK) in Autoradiogrammen von unbehandelten Präparaten und nach DNase-Behandlung.

SKZ/mK umgerechnet auf eine Expositionszeit von 1 d. (St.-Abw. = Standardabweichung).

		³ H-TdR	³ H-CdR
Keine DNase-Behandlung	Prozentsatz „stark“ markierter Kerne		
	(- ³ H-Index)	47,8	46,9
	(St.-Abw.)	(± 1,0)	(± 2,3)
	Prozentsatz „schwach“ markierter Kerne	—	51,5
	(St.-Abw.)		(± 1,8)
	SkZ/mK über den „stark“ markierten Kernen	18,2	16,9
	(St.-Abw.)	(± 1,0)	(± 0,3)
DNase-Behandlung	SkZ/mK über den „schwach“ markierten Kernen	—	0,62
	(St.- Abw.)		(± 0,017)
	Prozentsatz markierter Kerne	40,0	91,4
	(St.-Abw.)	(± 0,77)	(± 2,85)
	SkZ/mK	0,31	0,53
	(St.-Abw.)	(± 0,043)	(± 0,018)

Tab. 1:

Aus: MÜLLER, D. (1966c)

II. Die Utilisation des Desoxycytidins für die Desoxycytidyl- säure und Thymidylsäure der DNS

Wie einleitend besprochen wurde, erfolgt der Einbau des CdR in die DNS nicht nur als Desoxycytidylsäure, sondern auch als Thymidylsäure. Erste von REICHARD und ESTBORN (1951) an Ratten mit ^{15}N -Desoxycytidin durchgeführte biochemische Untersuchungen ergaben, daß von dem in die DNS eingebauten Vorläufer ca. 54 % auf die Desoxycytidylsäure und ca. 46 % auf die Thymidylsäure entfielen. Später erhoben auch MALEY und MALEY (1963) entsprechende Befunde, welche die Utilisation des CdR für die Thymidylsäure bestätigten.

Die eigenen Untersuchungen galten der Frage, ob HeLa-Zellen ebenfalls CdR als Thymidylsäure verwerten. Ferner sollte geklärt werden, ob das CdR konkurrierend mit dem TdR als Vorläufer für das DNS-TdR in Betracht kommt. Schließlich galt es zu prüfen, in welchem Verhältnis das CdR für die Thymidylsäure und die Desoxycytidylsäure der DNS utlilisiert wird.

1. Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß des Desoxycytidins auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation von HeLa-Zellen

Nach den bereits aufgezeigten Wegen ($\text{CdR} \rightarrow \text{UdR} \rightarrow \text{dUMP} \rightarrow \text{TMP}$ bzw. $\text{CdR} \rightarrow \text{dCMP} \rightarrow \text{dUMP} \rightarrow \text{TMP}$) kann das fertige Nukleosid CdR teilweise auch als Thymidylsäure verwertet werden. Daher wurde untersucht, ob das nicht markierte CdR einen Einfluß auf die ^3H -TdR-Inkorporation haben könnte (MÜLLER, 1966a).

HeLa-Zellen wurden in der üblichen Weise in Leighton-Röhrchen ausgesät. Die Inkubation des radioaktiv-markierten Vorläufers erfolgte in diesem Falle am 3. Tag nach der Aussaat der Zellen. Die Inkubationszeit betrug 20 Minuten. Es wurde der 3-H-TdR-Einbau bei vier verschiedenen CdR-Konzentrationen sowie in CdR-freiem Medium untersucht.

Die verwandten Medien enthielten gleichzeitig 3-H-TdR und nicht markiertes CdR in verschiedenen Konzentrationen. Die gebrauchten CdR-Konzentrationen lagen zwischen $0,0049 \mu\text{g/ml}$ und $4,9 \mu\text{g/ml}$ (Faktor 10). Daneben wurde CdR-freies Medium verwandt. Die 3-H-TdR-Konzentrationen betrugen $0,0049 \mu\text{g/ml}$ bis $4,9 \mu\text{g/ml}$ (Faktor 10). Bei der 3-H-TdR-Konzentration von $0,0049 \mu\text{g/ml}$ lag eine

spezifische Aktivität von 5.000 mC/mMol vor. Nach den Ergebnissen von Vorversuchen wurde die 3-H-Aktivität/ml Medium und somit auch die spezifische Aktivität für die höheren 3-H-TdR-Konzentrationen so bemessen, daß für die Auszählung günstige Silberkornzahlen in den Autoradiogrammen bei Expositionszeiten zwischen 2 und 20 Tagen zu erwarten waren. Daher wurde bei den höheren 3-H-TdR-Konzentrationen eine Verdünnung des 3-H-TdR durch zunehmende Mengen von nicht markiertem TdR vorgenommen. Den verschiedenen 3-H-TdR-Konzentrationen entsprach jeweils die folgende spezifische Aktivität:
0,049 µg/ml: 500 mC/mMol, 0,49 µg/ml: 250 mC/mMol,
49,0 µg: 50 mC/mMol.

Die Präparate und Autoradiogramme wurden in der üblichen Weise hergestellt und durch Silberkornzählungen über den markierten Kernen ausgewertet. Um die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) als Maß des 3-H-TdR-Einbaues in die DNS verwerten zu können, erfolgte zunächst für alle 3-H-TdR-Konzentrationen von 0,0049 bis 4,9 µg/ml eine Umrechnung auf eine spezifische Aktivität von 5.000 mC/mMol bzw. auf eine 3-H-Aktivität von 0,1 bis 100 µC/ml.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3 dargestellt. Bei äquimolaren Konzentrationen der Nukleoside sowie bei CdR-Konzentrationen, die niedriger lagen als die TdR-Konzentrationen, blieb die Silberkornzahl unbeeinflusst und entsprach derjenigen, die jeweils auch bei Inkubation in CdR-freien Medien ermittelt wurde. Dagegen nahm die SkZ/mK bei den CdR-Konzentrationen ab, die gegenüber der TdR-Konzentration (jeweils um eine Zehnerpotenz) erhöht waren. Das wurde besonders deutlich bei der niedrigsten ³H-TdR-Konzentration von 0,0049 µg/ml (siehe Kurve d), bei der mit steigender Konzentration des CdR die SkZ/mK, also der Einbau des ³H-TdR in die DNS, abnahm. Bei äquimolaren Konzentrationen beider Nukleoside war die SkZ/mK unverändert gegenüber dem CdR-freien Medium; bei einer Konzentration von 0,046 µg CdR/ml jedoch war sie gegenüber CdR-freiem Medium um ca. 18 % reduziert, bei der CdR-Konzentration von 0,46 µg/ml um ca. 34 %, bei der CdR-Konzentration von 4,6 µg/ml um ca. 65 %.

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist ein möglicher Hemmeffekt des CdR bei höheren Konzentrationen in Betracht zu ziehen. Gegen eine derartige Hemmwirkung spricht jedoch das Ergebnis einer unbeeinflussten ³H-TdR-Inkorporation bei der ³H-TdR-Konzentration von 4,9 µg/ml (siehe Kurve a in Abbildung 3). Hier blieb die SkZ/mK gegenüber CdR-freiem Medium bei den CdR-Konzentrationen von 0,0046 bis 4,6 µg/ml Medium unverändert.

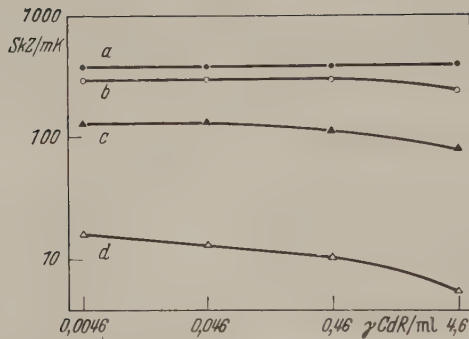


Fig. 1 Mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern (SkZ/mK) als Funktion der CdR-Konzentration bei verschiedenen Konzentrationen des ^3H -TdR: a) 4,9 γ TdR/ml Medium, b) 0,49 γ TdR/ml Medium, c) 0,049 γ TdR/ml Medium, d) 0,0049 γ TdR/ml Medium. Die SkZ/mK bei 0,0046 γ CdR/ml entspricht der SkZ/mK bei CdR-freiem Medium

Abb. 3:

Aus: MÜLLER, D. (1966a)

Aus diesen Ergebnissen ist die Schlußfolgerung erlaubt, daß HeLa-Zellen das CdR für die Thymidylsäure verwenden, aber die Utilisation erst meßbar wird, wenn das CdR in höherer Konzentration als gleichzeitig verabreichtes ^3H -TdR im Medium vorliegt.

2. Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Desoxycytidin verschiedener Markierungsformen sowie mit ^3H -Thymidin

Die bisherigen Untersuchungen, die quantitative Aussagen über die Utilisation des CdR für die Thymidylsäure und die Desoxycytidylsäure der DNS zum Ziel hatten, wurden mit biochemischen Methoden unter Verwendung von ^{15}N -CdR (REICHARD und ESTBORN, 1951) oder ^{14}C -CdR durchgeführt (MALEY und MALEY, 1963). Die nachfolgend besprochenen Untersuchungen an HeLa-Zellen, die der gleichen Fragestellung galten, erfolgten mit Hilfe der autoradiographischen Technik. Die Verwendung verschiedener Markierungsformen des ^3H -Desoxycytidins bietet nämlich die Möglichkeit, die Utilisation des Desoxycytidins für Thymidylsäure und die Desoxycytidylsäure der DNS zu ermitteln.

Eigene orientierende Voruntersuchungen hatten gezeigt, daß ^3H -CdR offenbar in wesentlich geringerem Maße für die DNS verwendet wird als das ^3H -TdR. Deshalb erfolgten in diesem Zusammenhang vergleichende autoradiographische Untersuchungen im Hinblick auf die Frage, in welchem quantitativen Verhältnis ^3H -TdR und ^3H -CdR in die DNS eingebaut werden.

a) Zur Verwendung von Desoxycytidin mit unterschiedlicher ^3H -Markierung:

Bei Verwendung eines radioaktiv-markierten Vorläufers ist die Stellung des markierenden radioaktiven Isotops innerhalb des Moleküls zu berücksichtigen. Das Tritium-markierte CdR ist von den Herstellern in zwei Markierungsformen erhältlich:

1. ^3H -CdR-(G), bei dem Wasserstoffatome in den Positionen 4 und 5 im Pyrimidinring und 1',2',3',4' und 5' in der Desoxyribose durch Tritiumatome ersetzt sind (siehe Abbildung 4).
2. ^3H -CdR-(5-T), bei dem lediglich das Wasserstoffatom in der Position 5 im Pyrimidinring durch Tritium ersetzt ist.

Diese Markierungsformen sind nach den aufgezeigten Möglichkeiten einer Utilisation des CdR für die Thymidylsäure und Desoxycytidylsäure von Bedeutung. Thymidylsäure (Thymidin-5'-monophosphat) weist in der Stellung 5 des Pyrimidinringes eine Methylgruppe auf. Bei der Methylierung des aus dem Desoxycytidin später entstehenden Desoxyuridin-5'-monophosphates wird das Wasserstoff- bzw. Tritiumatom (5-T) gegen eine Methylgruppe ausgetauscht. Als Thymidylsäure für die DNS utilisiertes ^3H -Desoxycytidin ist somit nicht mehr Tritium-markiert, die ^3H -DNS-Aktivität stammt also nur von der ^3H -Desoxycytidylsäure.

Das ^3H -CdR(G) weist Tritiumatome in insgesamt 13 verschiedenen Positionen auf, wobei die Verteilung eine gleichmäßige und rein statistische ist. Hierauf wird noch an anderer Stelle eingegangen (siehe IV, 2). Seine ^3H -Markierung wird bei der Methylierung des Desoxyuridin-5'-monophosphates und nachfolgendem Einbau als Thymidylsäure in die DNS im wesentlichen erhalten bleiben. Jedoch dürfte der Verlust des in der Stellung 5 in der Base angeordneten Tritiums eine Verringerung der spezifischen Aktivität des Moleküls um ca. 7,5 % zur Folge haben.

b) Durchführung des Versuches und Ergebnisse:

HeLa-Zellen wurden in der üblichen Weise für die Dauer von genau 60 Minuten in einem Medium inkubiert, das ^3H -CdR-(G) bzw. ^3H -CdR(5-T) bzw. ^3H -TdR enthielt. In allen Fällen betrug die ^3H -Aktivität 0,1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ Medium und die spezifische Aktivität 500 mC/mMol. Die ^3H -Aktivität pro ml Medium wurde bei allen Präparaten überprüft. Bei den drei Vorläufern lagen unter den gegebenen Verhältnissen äquimolare Konzentrationen vor. Ein Teil der Präparate wurde vor der Herstellung der Autoradiogramme mit RNase behandelt. Die Expositionszeiten der Autoradiogramme waren unterschiedlich gewählt worden, um gut auszählbare Silberkornzahlen zu erhalten. Bestimmt wurden die mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern (SkZ/mK) und der Prozentsatz der markierten Kerne.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Die ermittelte SkZ/mK zeigte bei allen drei Vorläufern, insbesondere jedoch bei dem ^3H -CdR-(5-T) und ^3H -CdR(G), eine Verringerung nach vorangegangener RNase-Behandlung. Der Prozentsatz der markierten Kerne war nur bei den ^3H -CdR-Präparaten vermindert. Unverändert blieb dagegen der Prozentsatz markierter Kerne (in diesem Falle gleich ^3H -Index) bei den ^3H -TdR-Präparaten.

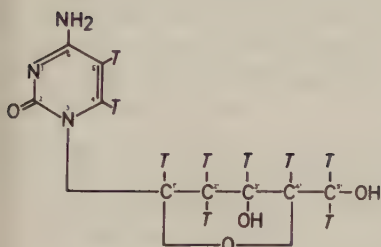


Abbildung 4: Positionen des Tritiums im ^3H -Desoxycytidin-(G)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Desoxyribo- nukleosid	SkZ / mK keine RNase- Behandlung	SkZ / mK RNase- Behandlung	% markierter Kerne keine RNase- Behandlung	% markierter Kerne RNase- Behandlung	SkZ / Kern keine RNase- Behandlung	SkZ / Kern* RNase- Behandlung
^3H -CdR (G)	1,67 ($\pm 0,064$)	1,30 ($\pm 0,10$)	48,3 ($\pm 1,7$)	47,4 ($\pm 3,42$)	0,805	0,716
^3H -CdR (5-T)	0,910 ($\pm 0,053$)	0,701 ($\pm 0,048$)	49,0 ($\pm 2,2$)	46,1 ($\pm 2,7$)	0,446	0,375
^3H -TdR- (methyl-T)	13,5 ($\pm 0,50$)	11,3 ($\pm 0,62$)	47,7 ($\pm 1,45$)	47,5 ($\pm 3,4$)	6,44	(6,44)

SkZ / mK = mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen, umgerechnet auf eine Expositionszeit von 1d.

SkZ / Kern = mittlere Silberkornzahl über allen Kernen, berechnet aus SkZ / mK und Prozent der markierten Kerne.

In Klammern = Standardabweichung.

* Die SkZ / Kern nach der RNase-Behandlung bei ^3H -CdR (G) und ^3H -CdR (5-T) wurde berechnet mit dem korrigierten Wert von SkZ / mK, entsprechend dem ^3H -DWS-Aktivitätsverlust von 16,0 % bei ^3H -TdR-Präparaten nach RNase-Behandlung.

Tabelle 2

Verhältnisse der Silberkornzahlen und des Prozentsatzes markierter Kerne nach Inkubation mit ^3H -CdR-(G), ^3H -CdR-(5-T) und ^3H -TdR an unbehandelten und mit RNase behandelten Präparaten.

c) Interpretation der Ergebnisse:

Durch diese Untersuchungen sollte das Verhältnis, in dem CdR für die Thymidylsäure und die Desoxycytidylsäure der DNS uti-
lisiert wird, bestimmt werden; ferner war festzustellen, in
welchem Ausmaß das CdR im Vergleich zum TdR in die DNS einge-
baut wird. Daneben lassen sich aus den Ergebnissen auch Schluß-
folgerungen hinsichtlich einer Verwertung des CdR für die RNS
ziehen.

Die nicht mit RNase behandelten ^3H -CdR-Präparate wiesen einen
höheren Prozentsatz markierter Kerne auf als jene nach RNase-
Behandlung und als die ^3H -TdR-Präparate. Nach ^3H -TdR-Inkuba-
tion bzw. bei ^3H -CdR-Präparaten nach RNase-Behandlung traten
nur die in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne als mar-
kiert in Erscheinung (= ^3H -Index); bei den unbehandelten ^3H -
CdR-Präparaten wiesen neben diesen noch weitere eine Markierung
auf infolge der Utilisation des ^3H -CdR für die RNS.

Wegen des unterschiedlichen Prozentsatzes markierter Kerne bei
Präparaten ohne und nach RNase-Behandlung konnten aus der mitt-
leren Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) keine
Vergleiche hinsichtlich der Größe inkorporierter ^3H -Aktivität
angestellt werden. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurde
aus der durch Auszählung bestimmten SkZ/mK (Tabelle 2, Spalte
2 + 3) und dem Prozentsatz markierter Kerne (Spalte 4 + 5) die
mittlere Silberkornzahl über allen (markierten und nicht mar-
kierten) Kernen berechnet, die "SkZ/Kern".

$$\text{SkZ/Kern} = \frac{\text{SkZ/mK} \times \text{\%-satz mark. Kerne}}{100}$$

Bei den ^3H -TdR-Präparaten zeigte sich erwartungsgemäß nach der
RNase-Behandlung auch eine Verminderung der Silberkornzahl. Die
SkZ/mK betrug nach RNase-Behandlung 11,3 gegenüber einer SkZ/mK
von 13,5 bei unbehandelten Präparaten (siehe Tabelle 2). Diese
Verminderung ist am ehesten darauf zurückzuführen, daß die in
nahezu allen Geweben nachgewiesene Desoxyribonuklease (SCHMIDT,
1955; DOUNCE, 1955; DOMAGK, 1964) in den HeLa-Zellen unter den
Bedingungen einer RNase-Behandlung aktiviert wird und zu einem
teilweisen Verlust der DNS und somit auch der ^3H -Aktivität
führt.

Es soll in diesem Zusammenhang auf die Frage eingegangen werden, ob nach ^3H -TdR-Inkubation ausschließlich eine Markierung der DNS und nicht gleichzeitig auch der RNS erfolgt und ferner, ob die Verringerung der Kornzahl pro Kern nicht die Folge der Herauslösung niedermolekularer Vorstufen der DNS sein könnte.

Nach den autoradiographischen Untersuchungen von AMANO, MESSIER und LEBLOND (1959), die durch DNase-Behandlung histologischer Schnitte der Maus nach ^3H -TdR-Verabreichung die ^3H -Aktivität restlos beseitigen konnten, war es wahrscheinlich, daß ^3H -TdR ausschließlich zu einer Markierung der DNS führt. Als wichtigster Beweis für diese Eigenschaft des TdR ist jedoch die Tatsache zu werten, daß nach einer Verabreichung von ^3H -Thymidin eine Markierung nur über den in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kernen zu finden ist. Auch bei einer hohen Silberkorn-dichte über den S-Phase-Kernen bleiben die übrigen Kerne gänzlich unmarkiert.

Andererseits ist es nach bisherigen Untersuchungen über die Verwertung des TdR sehr unwahrscheinlich, daß neben dem Einbau in die DNS auch Abbauprodukte entstehen, die als Vorläufer für die RNS in Betracht kommen (siehe IV, 1). HeLa-Zellen vermögen TdR zu Thymin und β -Ureido-iso-buttersäure abzubauen (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966), die nicht als Vorläufer der DNS gelten können.

Die vor der Herstellung der Autoradiogramme durchgeführten Waschungen des fixierten Zellmaterials sind geeignet, die nicht in die DNS eingebauten säurelöslichen Vorstufen zu entfernen. Untersuchungen an verschiedensten Zellsystemen haben gezeigt, daß die Zellen in der Lage sind, verabreichtes TdR in einem Phosphat-Pool zu speichern. Das trifft auch bei HeLa-Zellen zu (siehe V, 1), wie eigene Untersuchungen ergaben (MÜLLER, 1966). Diese zeigen zugleich, daß durch die angewandte Behandlung des Zellmaterials die im "Pool" gespeicherten, noch nicht in die DNS eingebauten Vorstufen aus der Zelle beseitigt werden.

Ebenso wie bei den ^3H -TdR-Präparaten ist auch bei den gleichzeitig behandelten ^3H -CdR-Präparaten infolge der RNase-Behandlung ein Verlust der ^3H -DNS-Aktivität zu erwarten. Daher wurde die SkZ/Kern (Tabelle 2, Spalte 7) berechnet mit dem korrigierten Wert von SkZ/mK, entsprechend dem ^3H -DNS-Aktivitätsverlust

bei ^3H -TdR-Präparaten von 16 % nach RNase-Behandlung.

Oben wurde darauf verwiesen (II, 2, a), daß infolge der Methylierung des für die DNS-TdR utilisierten ^3H -CdR-(G) ein Teil dessen ^3H -Aktivität verlorenggeht. Dieser teilweise Verlust bzw. diese Verringerung der spezifischen Aktivität muß berücksichtigt werden. Eine entsprechende Korrektur ist möglich, denn durch die parallele Verwendung von ^3H -CdR-(5-T) kann der Anteil der Silberkornzahl, der durch den Einbau des ^3H -CdR-(G) als DNS-CdR hervorgerufen wird, errechnet werden. Die entsprechend korrigierten Werte von SkZ/Kern betragen demnach 0,83^{für} Präparate ohne und 0,74 nach RNase-Behandlung.

Zunächst sollen die Werte von SkZ/Kern gegenübergestellt werden, die bei den ^3H -CdR-Präparaten ohne und nach RNase-Behandlung gewonnen wurden. Aus diesen Ergebnissen können ebenfalls Schlußfolgerungen hinsichtlich einer Utilisation des CdR für die DNS und die RNS gezogen werden. Bei den ^3H -CdR-(G)-Präparaten betrug die SkZ/Kern ohne RNase-Behandlung 0,83, nach RNase-Behandlung 0,74. Demnach wurden ca. 11 % der Silberkörner durch die in RNS eingebaute ^3H -Aktivität hervorgerufen. Nach ^3H -CdR-(5-T)-Inkubation betrug die SkZ/Kern ohne RNase-Behandlung 0,45, nach RNase-Behandlung 0,38. Der in die RNS eingebaute Anteil an ^3H -Aktivität war demnach mit ca. 15 % zu veranschlagen.

Durch die parallele Anwendung von ^3H -CdR-(G) und ^3H -CdR-(5-T) sollte das Verhältnis ermittelt werden, in dem CdR als Desoxycytidylsäure und als Thymidylsäure in die DNS eingebaut wird. Es wurden hier die Werte gegenübergestellt, die nach RNase-Behandlung gewonnen wurden. Nach den erforderlichen Korrekturen ergab sich für die ^3H -CdR-(G)-Präparate eine SkZ/Kern von 0,74. Dieser Wert repräsentiert die ^3H -markierte Desoxycytidylsäure und die ^3H -markierte Thymidylsäure der DNS. Entsprechend ergab sich für die ^3H -CdR-(5-T)-Präparate eine SkZ/Kern von 0,38. Diese ist nur bedingt durch die ^3H -markierte Desoxycytidylsäure der DNS. Aus diesen Resultaten ist zu folgern, daß das CdR zu 50,5 % für die Desoxycytidylsäure und zu 49,5 % für die Thymidylsäure der DNS utilisiert wird.

Ein weiteres Anliegen bei diesen Untersuchungen war, durch die gleichzeitige Anwendung von ^3H -TdR Aufschluß darüber zu erhalten, in welchem Ausmaß das CdR im Vergleich zum TdR in die DNS eingebaut wird. Es sollen daher die SkZ/Kern von ^3H -TdR (6,44), von ^3H -CdR-(G) (0,74) und von ^3H -CdR-(5-T) (0,38) gegenübergestellt werden. Setzt man den Wert von ^3H -TdR = 1, so ergibt sich folgendes Utilisationsverhältnis: ^3H -TdR : ^3H -CdR-(G) : ^3H -CdR-(5-T) = 1 : 0,11₅ : 0,058. Diese Ergebnisse zeigen, daß das TdR in wesentlich stärkerem Maße (Faktor 8,7) für die DNS utilized wird. Das Verhältnis von ^3H -CdR-(G) und -(5-T) = 0,11₅ : 0,058 wird verständlich aus dem oben abgeleiteten Utilisationsverhältnis für DNS-CdR und DNS-TdR. Auf absolute Größen der inkorporierten Vorläufer soll an anderer Stelle eingegangen werden.

3. Biochemische Untersuchungen zur Utilisation des ^3H -Desoxycytidins-(G) für die Desoxycytidylsäure und Thymidylsäure

Die vorherigen Untersuchungen mit Hilfe der autoradiographischen Technik wurden durch biochemische Untersuchungen mit ^3H -CdR-(G) ergänzt (MÜLLER und RATHENBERG, 1967).

In Roux-Flaschen gezüchtete HeLa-Zellen wurden 3 Tage nach dem Ansatz (6×10^4 Zellen/ml; 100 ml/Roux-Flasche) für die Dauer von 5 Stunden mit ^3H -CdR-(G) inkubiert (0,57 μC /ml, spezifische Aktivität 182 mC/mMol). Nach beendeter Inkubation erfolgte eine Spülung des Zellrasens und die Ernte der Zellen mit Hilfe eines Gummischabers. Nach mehrfachem Waschen wurde das Sediment in BSS aufgenommen und die Zellen durch Anwendung von Ultraschall zerstört. Hier-nach wurde die DNS nach der Methode von SCHNEIDER (1945), extrahiert. Nach dem enzymatischen Abbau der DNS erfolgte die Trennung des Desoxycytidin- und Thymidinmonophosphates in der Hochspannungselektrophorese (siehe B, 6).

Die direkte Messung der ^3H -Aktivität der in Quadrate aufgeteilten Flecken beider Substanzen im Flüssigkeits-Scintillations-zähler erbrachte folgende Ergebnisse: TMP: 1480 cpm, dCMP: 1560 cpm.

Nach dem oben (C, II, 2, a) zur Verteilung des Tritium im ^3H -CdR-(G) Gesagten, ist eine Korrektur des für TMP gemessenen Wertes erforderlich, da infolge der Methylierung des Desoxycytidins bzw. des Desoxyuridin-5'-monophosphates ein Teil der ^3H -Aktivität verlorenging. Danach würde CdR zu 51 % für TMP und zu 49 % für dCMP utilized. Diese Werte stehen in weitgehender Übereinstimmung mit den autoradiographischen Resultaten.

III. Untersuchungen zur Kinetik der Desoxycytidin-Inkorporation

=====

1. Die Inkorporation des Desoxycytidins als Funktion der Zeit

Zu diesen Untersuchungen gaben zunächst Befunde Anlaß, die bei der Verwendung von ^3H -Thymidin erhoben worden waren. Es hatte sich gezeigt, daß eine "Hemmung" der Thymidin-Inkorporation eintritt, wenn die Inkubation über mehr als eine Stunde fortgesetzt wird (RUBINI, KELLER, EISENTRAUT, CRONKITE, 1962; BIANCHI, CRATHORN, SHOOTER, 1962; ZAJIZEK, ROSIN, GROSS, 1962). Ursache dieser als "Hemmung" der TdR-Inkorporation gedeuteten Verringerung der Einbaurates mit fortschreitender Versuchszeit war, wie sich später herausstellte, der rasche Abbau des Vorläufers (siehe IV, 1). Auch von COOPER und MILTON (1964) wurden diese Beziehungen zwischen Inkorporation und Abbau des TdR untersucht und führten zu den gleichen Schlußfolgerungen. Sie schlossen in ihre Untersuchungen auch das ^3H -markierte Desoxycytidin-5'-monophosphat ein; jedoch zeigte sich hier ebenfalls bei fortschreitender Versuchszeit ein Nachlassen der Inkorporation als Folge des Abbaues dieser Substanz.

Es wurde nun der Einbau von ^3H -CdR-(5-T) in die Kerne der HeLa-Zellen als Funktion der Zeit unter Anwendung der autoradiographischen Technik untersucht (MÜLLER und ROCKER, 1967). Dies geschah, um festzustellen, ob CdR auch bei länger dauernder Versuchszeit als 1 Stunde unvermindert inkorporiert wird und eventuell zur Markierung der DNS als Vorläufer besser geeignet sein könnte als das TdR.

In Leightonröhrchen ausgesäte HeLa-Zellen (2×10^4 Zellen/ml Medium, 1,5 ml/Leighton-Röhrchen) erhielten am Tag nach der Aussaat 1,0 ml Medium, das ^3H -CdR-(5-T) mit einer Aktivität von 0,1 $\mu\text{C}/\text{ml}$ enthielt. (Spezifische Aktivität 5000 mC/mMol) Die CdR-Konzentration betrug demnach 0,0046 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium. Die Inkubationszeiten waren: 10, 20, 30, 60 und 90 Minuten, 2, 3, 5 und 8 Stunden. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen auf die übliche Weise fixiert, Autoradiogramme hergestellt, die mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern (SkZ/mK) sowie der Prozentsatz der markierten Kerne ermittelt.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 5 dargestellt. Die SkZ/mK zeigte bis etwa zum Ende der 1. Stunde nach Inkubationsbeginn einen fast linearen Anstieg. Später wurde die Zunahme der SkZ/mK

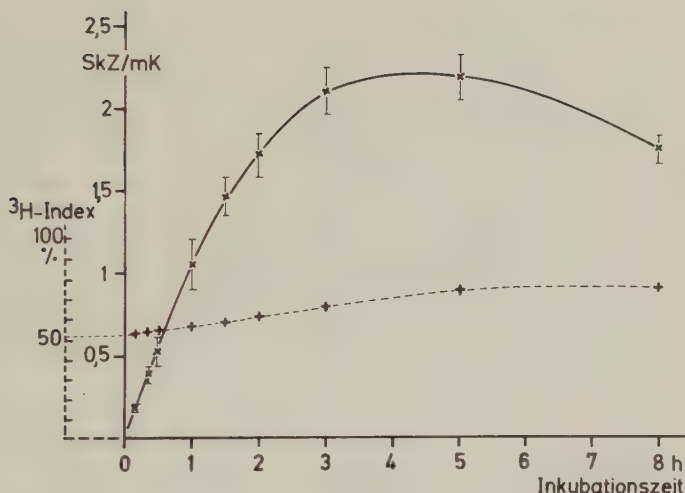


Abbildung 5

Einbau von ³H-Desoxycytidin-(5-T) in die Kerne der HeLa-Zellen als Funktion der Zeit.

(1,0 ml Medium/Leightonröhrchen, Aktivität: 0,1 μ C/ml; spezif. Aktivität 5.000 mC/mMol) Abszisse: Radioaktive Versuchszeit; Ordinate: Mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen, unterbrochene Ordinate: Prozentsatz markierter Kerne. - Linearer Anstieg der SkZ/mK in der 1. Stunde, danach verminderte Zunahme und schließlich Verringerung der SkZ/mK infolge der Teilung markierter Kerne. Gestrichelte Kurve: Zeitlicher Verlauf des Prozentsatzes markierter Kerne (20 Minuten nach Versuchsbeginn 52 %, Anstieg bis zur 8. Stunde auf 76 %).

(Aus: MÜLLER und ROCKER, 1967)

geringer. Der Scheitelpunkt der Kurve lag zwischen drei und fünf Stunden. Der Prozentsatz markierter Kerne betrug nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten 52 %. In den folgenden Stunden war eine Zunahme bis zu 76 % zu beobachten.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß sich die Einbaurrate des ^3H -CdR in die Kerne der HeLa-Zellen nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde vermindert, und bei etwa 4 Stunden kein weiterer Einbau mehr stattfindet. Der Abfall der Kurve gegen 8 h ist folgendermaßen erklärbar: Zwischen der Zeit Null und 4 bis 5 h hat bereits eine größere Zahl von Zellen die G-2- und auch die Mitose-Phase durchlaufen (siehe VI, 1, 2). Demnach muß die in der vorangegangenen S-Phase in die DNS eingebaute ^3H -Aktivität nach der Mitose auf zwei Tochterzellen aufgeteilt worden sein. Es nimmt also bei vorgerückter Versuchszeit die Zahl derjenigen Zellen zu, deren SkZ/mK nur 50 % derjenigen beträgt, wie sie in der 1. oder 2. Versuchsstunde gefunden wurde.

Um Aufschluß darüber zu gewinnen, ob die Verringerung der Einbaurrate und das spätere Ausbleiben einer Inkorporation des verabreichten Vorläufers darauf beruht, daß dieser abgebaut wird, wurde ein weiterer Versuch in abgewandelter Form durchgeführt.

Nach Aussaat der gleichen Zellmenge fand die Inkubation des ^3H -CdR-(5-T) am folgenden Tag statt. (Gleiche Aktivität und gleiche spezifische Aktivität wie im vorangegangenen Versuch.) Es wurden jedoch 2,0 ml Medium zu jedem Leighton-Röhrchen gegeben und jeweils nach zwei Stunden (soweit die Kulturen über diese Zeit hinaus inkubiert wurden) durch neues Medium aus dem gleichen Ansatz ersetzt. Die Fixierungen erfolgten nach 1, 2, 3, 4, 5, 7 und 10 h. Die SkZ/mK und der Prozentsatz der markierten Kerne wurden in der gleichen Weise bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Es zeigte sich über eine Stunde hinaus ein nahezu linearer Anstieg; jedoch wurde bei 10 h nicht der 10-fache Wert der SkZ/mK von 1 h gefunden. Zu diesem Zeitpunkt betrug die SkZ/mK 8,0 ($s = \pm 0,74$). Ein linearer Anstieg ist jedoch über einen Zeitraum von 10 Stunden nicht zu erwarten. Wie oben bereits erläutert, wird - nachdem ein Teil der Zellen die Mitosephase durchlaufen hat - deren ^3H -Aktivität auf zwei Tochterzellen aufgeteilt. Demnach lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, daß unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine kontinuierliche Inkorporation des ^3H -CdR

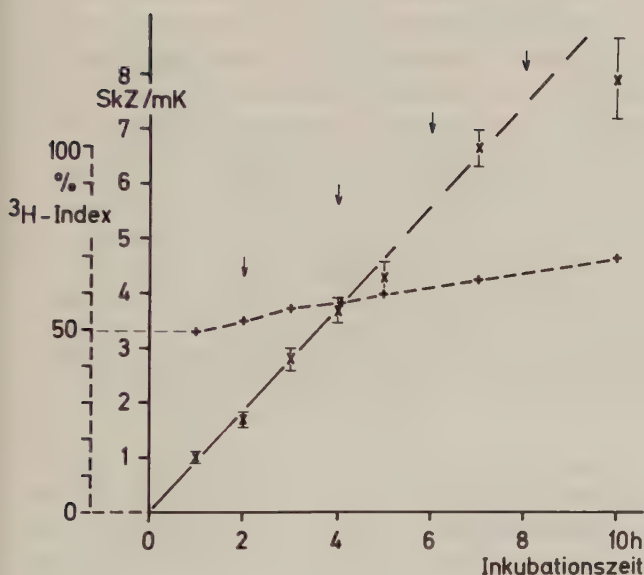


Abbildung 6

Einbau von ^3H -Desoxycytidin-(5-T) in die Kerne der HeLa-Zellen als Funktion der Zeit.

(2,0 ml Medium/Leightonröhrchen; Aktivität: $0,1 \mu\text{C}/\text{ml}$, spezif. Aktivität: $5.000 \text{ C}/\text{mMol}$; Erneuerung des Mediums jeweils nach zwei Stunden (Pfeile)) Abszisse: Radioaktive Versuchszeit; Ordinate: Mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen, unterbrochene Ordinate: Prozentsatz markierter Kerne. - Linearer Anstieg der SkZ/mK über die Versuchszeit. Gestrichelte Kurve: Zeitlicher Verlauf des Prozentsatzes markierter Kerne. (Aus: MÜLLER und ROCKER, 1967)

stattgefunden hat.

Zunächst soll hier noch ein Untersuchungsergebnis vorgelegt werden, das bei Verwendung von ^3H -CdR (G) gewonnen wurde (siehe II und IV). Auch hier wurde die Inkorporation als Funktion der Zeit untersucht. Da in diesem Zusammenhang jedoch nur relative Beziehungen zwischen der Menge inkorporierter ^3H -Aktivität zu verschiedenen Versuchszeiten von Interesse waren, wurden die Aktivitätsmessungen am fixierten Zellrasen vorgenommen (siehe B, 4, b)

Die HeLa-Zellen wurden in Meßküvetten ausgesät (10^5 Zellen/ml; 5,0 ml/Küvette). Die Inkubation erfolgte am Tag nach der Aussaat. Pro Küvette wurden 2,0 ml Medium verabreicht. Dieses enthielt pro ml 0,1 μC ^3H -CdR (sp. Akt. 5000 mC/mMol). Die Fixierung von jeweils 6 Küvetten erfolgte nach 1, 2, 3, 6 und 8 Stunden. Aus einem Teil der Küvetten wurde das Medium nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden abgesaugt und durch 2,0 ml neues Medium ersetzt. Der Zellrasen wurde nach der 5. und 8. Stunde fixiert. An sämtlichen Präparaten wurde eine RNase-Behandlung durchgeführt. Nach Einfüllen der Scintillationsflüssigkeit erfolgte die Aktivitätsmessung.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 als "cpm/Küvette" dargestellt. In ähnlicher Weise wie bei den vorherigen autoradiographischen Untersuchungen, bei denen ^3H -CdR-(5-T) angewendet worden war, zeigte sich auch hier nach 2 Stunden eine Abnahme und später ein Aufhören des Einbaus von ^3H -CdR-(G). Dagegen hatte eine wiederholte Verabreichung des gleichen Mediums ein erneutes Ansteigen der Inkorporation zur Folge.

Den Untersuchungsergebnissen kann man entnehmen, daß die Abnahme der Inkorporationsrate und schließlich das gänzliche Aufhören des Einbaues von ^3H -Aktivität in die Kerne der HeLa-Zellen nicht als Hemmeffekt anzusehen sind. Die gleichbleibende Einbaurrate bei Erneuerung des Mediums während des Versuchs legt vielmehr die Vermutung nahe, daß die Abnahme der Einbaurrate bei dem Verbleib der Zellen im zuerst verabreichten Medium auf einem raschen Abbau des Vorläufers beruht. Diese Annahme stellte sich nach späteren biochemischen Untersuchungen als richtig heraus. Hierauf soll jedoch an anderer Stelle eingegangen werden. (IV, 2).

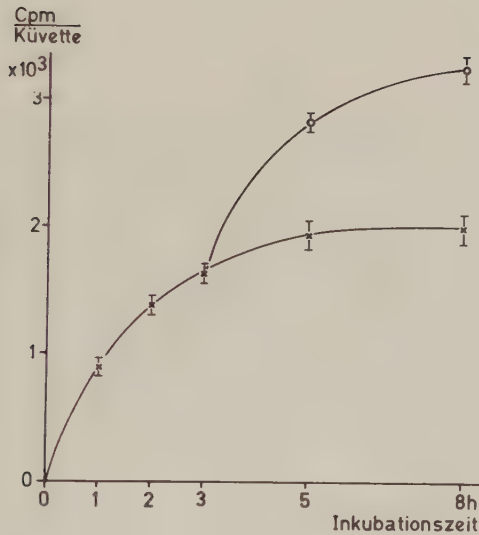


Abbildung 7

Einbau von ^3H -Desoxycytidin-(G) in die Kerne von HeLa-Zellen als Funktion der Zeit:

Inkubation der HeLa-Zellen in Meßküvetten (10^5 Zellen/ml; 5,0 ml/Küvette), $0,1 \mu\text{C}$ ^3H -CdR-(G)/ml (spez. Akt. 5.000 mC/mMol), 2 ml/Küvette am Tage nach der Aussaat. Erneuerung des Mediums bei einem Teil der Küvetten (o) nach der 3. Stunde. RNase-Behandlung. Abszisse: Radioaktive Inkubationszeit, Ordinate "cpm/Küvette". Mit fortdauernder Versuchszeit verringert sich die Menge eingebauter ^3H -Aktivität (x). Erneuerung des Mediums in der 3. Stunde hat eine weitere Zunahme der Inkorporation von ^3H -Aktivität zur Folge (o).

2. Die Inkorporation des Desoxycytidins als Funktion der Konzentration

Durch die nachfolgend geschilderten autoradiographischen Untersuchungen (MÜLLER und ROCKER, 1967) sollte die Inkorporation des CdR in die DNS und in RNS, in Abhängigkeit von der im Medium vorgelegten Konzentration des ^3H -markierten Vorläufers, bestimmt werden. Hierfür fand ^3H -CdR-(5-T) Verwendung.

Die ^3H -CdR-Konzentrationen/ml Medium betrugen 0,0042 μg , 0,0079 μg , 0,46 μg , 0,045 μg und 4,5 μg . Bei den ersten drei Konzentrationen betrug die spezifische Aktivität 5.000 mC/mMol, bei den höheren Konzentrationen wurde die spezifische Aktivität durch Zugabe inaktiven Vorläufers vermindert. Die verwendeten Aktivitäten lagen zwischen 0,092 und 4,0 μC . Die Untersuchung der Inkorporationsrate bei niedrigeren oder höheren Konzentrationen war, wie Versuche zeigten, wegen der zu erwartenden geringen Silberkornzahl auch bei langen Expositionszeiten nicht möglich. Die Inkubation erfolgte für 60' mit 1,5 ml Medium/Leightonröhrchen. Ein Teil der Präparate wurde vor der Herstellung der Autoradiogramme mit RNase behandelt (siehe B, 7). Bestimmt wurde die SkZ/mK und der Prozentsatz der markierten Kerne, wobei sich die Auswertung für jede Konzentration auf 5 mit RNase behandelte und 5 unbehandelte Präparate bezog.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 8 als "SkZ/Kern" dargestellt. Diese wurde aus der SkZ/mK und dem Prozentsatz der markierten Kerne ermittelt. Auf diese Weise konnten die Werte von unbehandelten und mit RNase behandelten Präparaten gegenübergestellt werden (siehe C, II, 2, c). Denn infolge der Utilisation des CdR für die RNS treten bei den unbehandelten Präparaten nicht nur die in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne als markiert in Erscheinung, was besonders bei höheren CdR-Konzentrationen deutlich wurde. So betrug der Prozentsatz markierter Kerne bei einer Konzentration von 4,5 μg CdR/ml in unbehandelten Präparaten 95 % gegenüber 47 % nach RNase-Behandlung. Die errechnete SkZ/Kern wurde für alle Konzentrationen auf eine einheitliche spezifische Aktivität von 5.000 mC/mMol bezogen.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß im Bereich der verwendeten Konzentrationen keine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Vorläufers im Medium und der in die Kerne eingebauten ^3H -Aktivität besteht. Das Auseinanderweichen der beiden Kurven, welche die SkZ/Kern von Präparaten ohne und nach RNase-Behand-

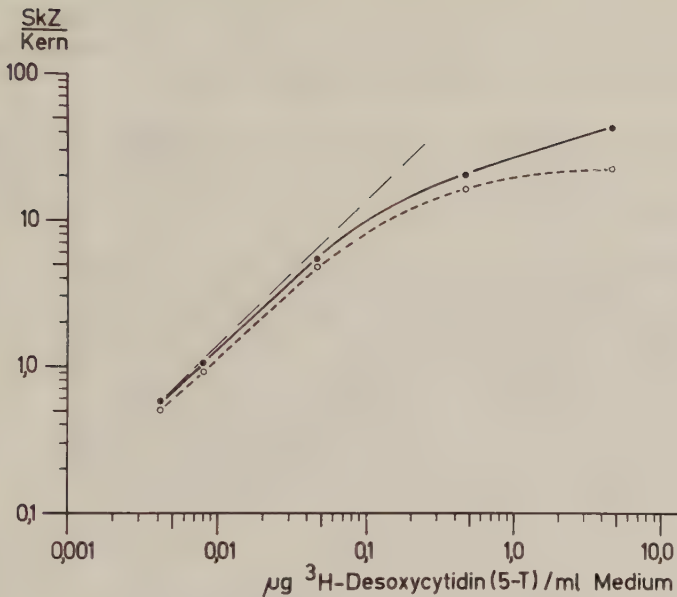


Abbildung 8

Die Inkorporation des ^3H -CdR-(5-T) als Funktion der Konzentration

Abszisse: Konzentration des ^3H -CdR-(5-T). Ordinate: SkZ/mK. SkZ/Kern errechnet aus der mittleren Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) und dem Prozentsatz der markierten Kerne. Die Werte sind bezogen auf eine konstante spezifische Aktivität von 5.000 mC/mMol für sämtliche CdR-Konzentrationen. (Durchgezogene Kurve: keine RNase-Behandlung, gestrichelte Kurve: RNase-Behandlung, die unterbrochene Linie (90°) deutet ein lineares Verhältnis zwischen der Konzentration und der Utilisation an.) Das Auseinanderweichen der Kurven im Bereich höherer Konzentrationen deutet auf eine zunehmende Utilisation des CdR für die RNS hin.

(Aus: MÜLLER und ROCKER, 1967)

lung repräsentieren, macht deutlich, daß das CdR insbesondere bei höheren Konzentrationen in stärkerem Maße für die RNS uti-
lisiert wird. Hierfür spricht auch die Zunahme des Prozentsatzes
markierter Kerne bei den höheren Konzentrationen.

Mit der gleichen Technik wie in III, 1 (Inkorporation als Funk-
tion der Zeit) wurde die Inkorporation des ^3H -CdR-(G) als Funk-
tion der Konzentration untersucht (siehe auch B, 4, b).

In Messküvetten ausgesäte HeLa-Zellen (10^5 Zellen/ml;
5,0 ml/Küvette) wurden am Tage nach der Aussaat für
die Dauer von 60' in 3-H-CdR-(G)-haltigem Medium in-
kubiert (2,0 ml Medium/Küvette). Die CdR-Konzentratio-
nen betrugen 0,0045 μg bis 4,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Faktor 10). Die
verwendeten Aktivitäten lagen zwischen 0,02 und 5,0 μC
/ml. Bei der niedrigsten CdR-Konzentration betrug die
spezifische Aktivität 1000 mC/mMol. Bei den höheren
Konzentrationen wurde die spezifische Aktivität weiter
durch Zugabe inaktiven Desoxycytidins verringert. Nach
beendeter Inkubation erfolgten die Fixierung, die Wa-
schung, die RNase-Behandlung und Aktivitätsmessung.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 9 als "cpm/Küvette" nach
Umrechnung auf eine einheitliche spezifische Aktivität darge-
stellt. Diese nach RNase-Behandlung gewonnenen Werte repräsen-
tieren die in die DNS eingebaute ^3H -Aktivität. Der Kurvenver-
lauf ist identisch mit jenem, der sich aus den Silberkornaus-
zählungen von RNase-behandelten Präparaten nach ^3H -CdR-(5-T)-
Inkubation ergab (Abbildung 9).

Auf diese Befunde soll an anderer Stelle noch näher eingegangen
werden.

IV. Der Abbau der Pyrimidin-Desoxyribonukleoside Thymidin und Desoxycytidin durch HeLa-Zellen

1. Biochemische Untersuchungen zum Abbau des Thymidins

Der Abbau des Thymidins war bisher an menschlichen Leukozyten
(COOPER und MILTON, 1964; MARSH und PERRY, 1964 a, b), Mäuse-
Thymocyten (COOPER und MILTON, 1964) sowie an Ascites-Zellen
(JACQUEZ, 1962; ZAJICEK, BERNSTEIN und ROSIN, 1963) untersucht
worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß

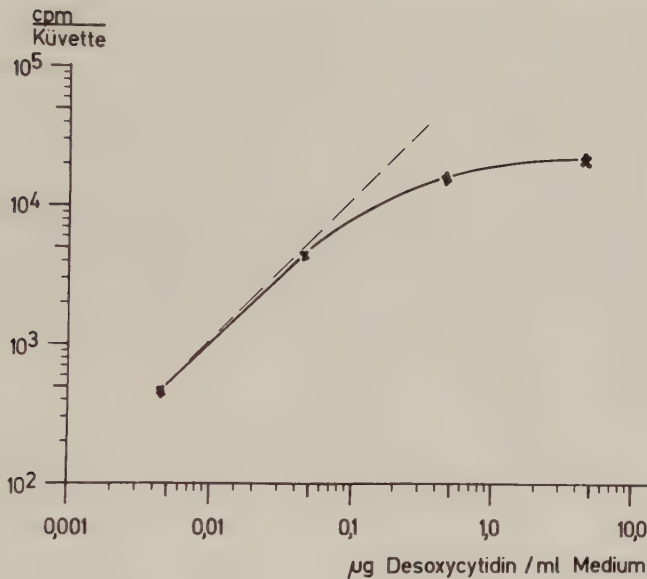


Abbildung 9

Die Inkorporation des ^3H -CdR-(G) als Funktion der Konzentration

Inkubation der HeLa-Zellen in Meßküvetten (10^5 Zellen/ml Medium, 5,0 ml/Küvette) am Tage nach der Aussaat. Inkubationszeit 60 Minuten. CdR-Konzentrationen zwischen 0,0049 und 4,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium (Faktor 10). Spezifische Aktivität 1000 mC/mMol bei 0,0049 $\mu\text{g}/\text{ml}$; bei steigender CdR-Konzentration Verdünnung durch inaktives CdR. RNase-Behandlung. Abszisse: $\mu\text{g}/\text{ml}$; Ordinate: "cpm/Küvette", bezogen auf eine einheitliche spezifische Aktivität.

Mammalier-Zellen das verabreichte Thymidin zu Thymin, Dihydrothymin bzw. β -Ureido-iso-buttersäure abbauen. Entsprechende Untersuchungen wurden an HeLa-Zellen von LANG, MÜLLER und MAURER (1966) durchgeführt.

In Roux-Flaschen gezüchtete HeLa-Zellen (Aussaat 5×10^4 Zellen/ml Wachstums-Medium, 100 ml/Roux-Flasche) erhielten 42 Stunden nach der Zellaussaat 3-H-Thymidin (0,25 μ C/ml, spezifische Aktivität 120 mC/mMol). In dem nachfolgenden Zeitraum von 48 Stunden wurden aliquote Teile des Mediums entnommen und die radioaktiven Abbauprodukte des 3-H-TdR untersucht. Nach Entfernung des Eiweißes aus dem Medium erfolgte zunächst eine Auftrennung mittels Hochspannungselektrophorese (siehe Abbildung 10). Auf diese Weise konnte das Thymidin-Monophosphat direkt isoliert werden. Die auf der Kathodenseite liegenden Abbauprodukte (bzw. die zu ihrer Auffindung verwendeten Vergleichssubstanzen) TDP, TTP und BUIB sowie die auf der Anodenseite liegenden Substanzen BAIB, TDR, T und DHT mußten durch absteigende Papierchromatographie weiter aufgetrennt werden. Die Radioaktivität der Abbauprodukte wurde durch Flüssigkeits-Scintillationsmessung bestimmt (HEMPEL, 1964).

In der nachfolgenden Abbildung 11 sind das ^3H -Thymidin und dessen radioaktiv-markierte Abbauprodukte als Funktion der Versuchszeit bis zu 24 Stunden dargestellt, und zwar als Prozentsatz der Ausgangsaktivität des Mediums. Es zeigte sich, daß während der ersten Stunden des Versuches ein sehr rascher Abbau des TDR im Medium stattfindet, der wiederum in direkter Beziehung steht zu einem ebenso raschen Anstieg von radioaktivem Thymin. Mit deutlicher Verzögerung wurde sodann ein weniger steiler Anstieg radioaktiver β -Ureido-iso-buttersäure sichtbar. Von dem Intermediärprodukt DHT fanden sich nur Spuren von Radioaktivität (1 - 2 %). TMP konnte ebenso wenig wie andere phosphorylierte Produkte oder β -Amino-iso-buttersäure nachgewiesen werden.

COOPER und MILTON (1964) fanden im Kulturmedium normaler menschlicher Leukozyten bei einer Versuchszeit über 90 Minuten neben dem Thymidin die Abbauprodukte Thymin und Dihydrothymin. Die gleichen Substanzen wurden bei der Untersuchung des Mediums menschlicher Leukozyten identifiziert, die von einer chronischen myeloischen Leukämie stammten. Der in diesen Experimenten nachgewiesene weitergehende Abbau des Thymidins zu Dihydrothymin kann auf den anderen Zellarten beruhen, oder mit der hier verwendeten höheren Zellzahl pro Volumeneinheit zusammenhängen.

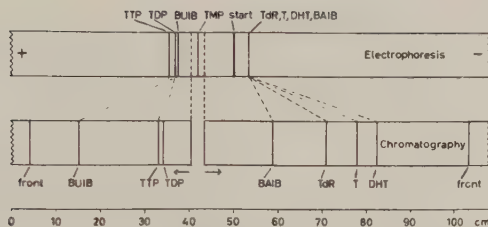


Fig. 1.—Separation of thymidine degradation products by a combined electrophoretic and paper chromatographic method. The electrophoretic paper was cut along two vertical dotted lines and descendingly chromatographed without elution. *Electrophoresis*: Buffer - pyridine/acetic acid/water (4:1:47, v/v); pH, 5.1; field strength = 40 V/cm; $t = -8^{\circ}\text{C}$, 150 min; paper: Schleicher & Schüll 2043 b MgL. *Paper chromatography*: Acetic acid-ethyl-ether/formic acid/ water (60:5:35, v/v, upper phase).

Abbildung 10: aus LANG, MÜLLER und MAURER (1966)

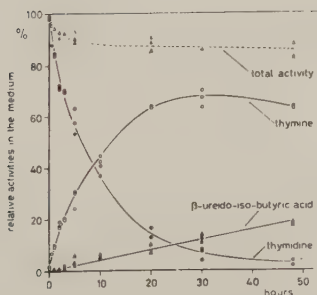


Fig. 2.—Percentage of ^3H -TdR and its labelled degradation products in the culture medium of HeLa cells after various time intervals of incubation with ^3H -TdR. Inoculation with 5×10^4 cells/ml; 42 hr later ^3H -TdR was added (0.25 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 120 mCi/mM); the points represent results from three different experiments.

Abbildung 11: aus LANG, MÜLLER und MAURER (1966)

MARSH und PERRY (1964 a, b) fanden in Homogenaten normaler und leukämischer menschlicher Leukozyten als Abbauprodukte des Thyminidins Thymin, Dihydrothymin und die β -Ureido-iso-buttersäure.

2. Biochemische Untersuchungen zum Abbau des Desoxycytidins

Wie einleitend dargelegt wurde, sind bisher über den Abbau des CdR nur wenige Untersuchungen bekannt (SCHNEIDER und ROTHERHAM, 1961). Diese wurden unter Verwendung sehr kleiner Substanz- und Zellmengen sowie über kurze Versuchszeiten durchgeführt. Durch die nachfolgend dargelegten Untersuchungen (MÜLLER und RATHENBERG, 1967) sollte festgestellt werden, in welcher Weise sich der Abbau des CdR durch die HeLa-Zellen vollzieht und welche die Hauptabbauprodukte des CdR sind. Nachdem sich in Vorversuchen die Uridindesoxyribose als ein wichtiges Abbauprodukt erwiesen hatte, wurde dieser Versuch über einen Zeitraum durchgeführt, der es ermöglicht, den weiteren Abbau der Uridindesoxyribose zu verfolgen.

Die Untersuchungen erfolgten an HeLa-Zellen, die aus einer homogenen Zellsuspension in gleichen Volumina (100 ml) in Roux-Flaschen ausgesät waren. Das Medium wurde am 2. Tag nach dem Ansatz gewechselt. Am 3. Tag erfolgte die Inkubation mit 3-H-CdR-haltigem Medium. Nach Abgießen des Mediums wurde der Zellrasen mit BSS gespült. Daraufhin erhielten 6 Roux-Flaschen je 80 ml 3-H-CdR-(G)-haltigen Mediums. Seine Zusammensetzung entsprach dem "Versuchsmedium" ohne Kälberserum (siehe B, 1). Das 3-H-CdR-(G) (spezifische Aktivität 991 mC/mMol, radiochemische Reinheit 97,5 %) wurde mit einer Aktivität von 1,02 μ C/ml verabreicht. Durch Verdünnung mit inaktivem CdR wurde die spezifische Aktivität auf 295 mC/mMol herabgesetzt. Die Konzentration des CdR betrug demnach 0,782 μ g/ml. Zu verschiedenen Zeiten nach Beginn des Versuchs (20, 40, 80, 150'; 4, 6, 8h) wurden jeweils 5,0 ml des Mediums entnommen.

Zur Bestimmung der Gesamtaktivität des Mediums wurden zu den verschiedenen Zeiten (einschließlich Zeitpunkt Null) jeweils 5 x 50 μ l aus aliquoten Anteilen mit einer "Marburger Spritze" (EPPENDORF, Hamburg) entnommen und im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen. Ferner wurde der Anteil der nicht flüchtigen Aktivität bestimmt. Hierzu wurden in entsprechender Weise gleiche Mengen des Mediums von 0 bis 8 h in Probenfläschchen eingefüllt und gefriergetrocknet. Die festen Rückstände wurden vor Einfüllung der Scintillationsflüssigkeit in 0,45 ml Wasser gelöst.

Von dem jeweils abpipettierten Medium dienten 2,0 ml zur Bestimmung des prozentualen Anteils der Aktivität des CdR und seiner Abbauprodukte an der nicht flüchtigen Gesamtaktivität. Die Trennung der Substanzen erfolgte durch

kombinierte Anwendung der Hochspannungselektrophorese und der Papierchromatographie (siehe B, 5). Es wurden folgende Substanzen untersucht: Desoxycytidin, Desoxyuridin, Uracil, Cytosin, Thymidin, Thymin, Desoxyuridin-Monophosphat, Thymidin-Monophosphat und Desoxycytidin-Monophosphat. Unberücksichtigt blieben weitere Abbauprodukte wie Dihydrothymin, β -Ureidoisobuttersäure, β -Aminoisobuttersäure etc., nachdem sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß diese im Verhältnis zu den anderen Abbauprodukten nur in sehr geringer Menge zu erwarten sind.

Nach Beendigung der radioaktiven Versuchszeit (8 h) erfolgte nach der Beseitigung des Mediums die Ernte des Zellrasens durch Anwendung von Versenlösung. Die Zellernnte sämtlicher Roux-Flaschen wurde gesammelt und das Sediment nach der Zentrifugation bei -20°C aufbewahrt. Später erfolgte nach Waschung und Zentrifugation des aufgetauten Materials die Homogenisierung der Zellen mittels Ultraschall und die Extraktion der DNS und RNS nach der Methode von SCHNEIDER (1945). Die DNS-Menge wurde photometrisch mit der Diphenylamin-Reaktion nach DISCHE (1930) bestimmt. Die Gesamtmenge der DNS betrug, umgerechnet auf den mittleren Gehalt einer Roux-Flasche $6,07 \times 10^{-4}\text{g}$. Ein Teil des die DNS sowie vorwiegend nukleäre RNS enthaltenden Extraktes wurde zur Bestimmung der gemeinsamen 3-H-Aktivität verwendet. Aliquote Anteile wurden auf Filtrierpapier getropft und nach Trocknung in Sauerstoffatmosphäre verascht. Umgerechnet auf eine Roux-Flasche betrug die 3-H-Aktivität $0,81 \mu\text{C}$.

Ehe auf die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse eingegangen wird, müssen vorher die notwendigen Korrekturen erläutert werden:

a) Für die Untersuchungen wurde ^3H -CdR-(G) verwandt, bei dem gegen Wasserstoff ausgetauschtes Tritium in 9 verschiedenen Positionen in gleichmäßiger statistischer Verteilung zu finden ist. Der Austausch des Tritiums gegen Wasserstoff liegt dort vor, wo es in direkter Bindung zu Kohlenstoff steht. Das ist der Fall in 7 verschiedenen Positionen des Desoxyriboseanteils und in den beiden Positionen 4 und 5 des Basenanteils (siehe auch C, II, 2 sowie Abbildung 4). Bei dem Abbau des Desoxycytidins gehen daher in einigen Fällen mehr oder weniger große Anteile der Aktivität verloren, die spezifische Aktivität der Abbauprodukte wird gegenüber der spezifischen Aktivität des ^3H -Desoxycytidins vermindert. Es ist daher eine Umrechnung auf die spezifische Aktivität des Desoxycytidins notwendig. Nach diesen Umrechnungen ist zu erwarten, daß die errechnete Aktivität des CdR und der Abbauprodukte um einen Betrag erhöht wird,

der etwa der Differenz zwischen der Gesamtaktivität des Mediums und der Aktivität der nichtflüchtigen Bestandteile entspricht. Die Ergebnisse stimmen weitgehend mit dieser Annahme überein, was für eine gleichmäßige statistische Verteilung des Austauschs von Tritium gegen Wasserstoff in den genannten Positionen spricht.

b) Während des Versuchszeitraumes von 8 Stunden wurden insgesamt 6-mal je 5 ml Medium aus dem zu Versuchsbeginn vorliegenden Gesamtvolumen von 80 ml entnommen. Deshalb war eine Volumenkorrektur nötig, indem sämtliche Werte auf das Ausgangsvolumen von 80 ml bezogen werden mußten.

c) Innerhalb des Versuchszeitraumes war eine Zunahme der Zellzahl zu erwarten. Um den Umsatz des verabreichten Vorläufers auf eine bestimmte Zellzahl beziehen zu können, mußten in einer parallelen Versuchsanordnung Zellzählungen durchgeführt werden.

Zu Beginn des aktiven Versuches (siehe oben) wurden 4 Roux-Flaschen nach Entfernung des Mediums mit BSS gespült und anschließend die Zellrasen durch Anwendung von Versenlösung (siehe VIII, 2) geerntet. Dann wurde die Gesamtzellzahl pro Roux-Flasche durch Zellzählung ermittelt. Weitere 4 Roux-Flaschen erhielten ebenfalls zur Zeit Null nach Spülen mit BSS 80 ml "Versuchsmedium", das inaktives CdR in einer Konzentration enthielt, die jener im aktiven Versuch entsprach. In gleichen Zeitabständen wurden auch aus diesen Flaschen (ebenso wie im aktiven Versuch) jeweils 5 ml Medium entnommen und verworfen. Der Zellrasen dieser 4 Roux-Flaschen wurde am Ende der Versuchszeit (also nach 8 h) geerntet und auch hier die Zellzahl/Roux-Flasche bestimmt.

Die Zellzahlen/Roux-Flasche betrugen im Mittel zu den Zeiten

$$0 \text{ h} = 3,19 \times 10^7 \text{ (s} = \pm 0,34\text{)}$$

$$8 \text{ h} = 4,29 \times 10^7 \text{ (s} = \pm 0,26\text{)}$$

Aus den Ergebnissen dieser Zellzählung wurde zunächst die Generationszeit der Zellen nach folgender Formel bestimmt:

$$T = \frac{t \times \log 2}{\log \frac{Z_t}{Z_0}}$$

(T = Generationszeit, t = Untersuchungszeitraum, Z_0 = Zellzahl zur Zeit 0, Z_t = Zellzahl am Ende des Untersuchungszeitraumes (im vorliegenden Fall = 8 h)).

Danach betrug im vorliegenden Fall die Generationszeit 18,8 Stunden.

Die Generationszeit einer Zellkultur kann jedoch ebenso durch Ermittlung des ^3H -Index bestimmt (siehe VI, 2) werden. Das geschah auf folgende Weise:

Zu Beginn des radioaktiven Versuchs wurden 2 weitere Roux-Flaschen unter gleichen Bedingungen gehalten wie jene zur Zellzählung. Etwa 5 Stunden nach Versuchsbeginn erhielten die Zellkulturen 3-H-TdR (0,1 $\mu\text{C}/\text{ml}$, spezifische Aktivität 5000mC/mMol). Die Inkubationszeit betrug 60'. Die Zellen wurden anschließend durch kurzzeitige Behandlung mit Versenlösung geerntet und in der Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde mit Alkohol-Eisessig (3 : 1, v/v) fixiert und anschließend auf Objektträger aufgetropft. Nach der üblichen Vorbehandlung wurden Autoradiogramme hergestellt und der 3-H-Index durch Auszählung von jeweils 2000 Zellen der 2 Roux-Flaschen bestimmt.

Die Abbildung 12 zeigt das ^3H -CdR und seine Abbauprodukte Uridindesoxyribose, Uracil und Cytosin als Funktion der Versuchszeit zwischen 0 und 8 h, und zwar als Prozentsatz der Ausgangsaktivität des Mediums. Ferner ist das Verhalten der Gesamtaktivität sowie der nichtflüchtigen Aktivität angegeben. Die ^3H -Indices betrugen 45,0 und 45,5. Sie gelten für eine Inkubationszeit von 60'. Aus diesen konnte die Generationszeit berechnet werden, da die Dauer der konstanten Teilphasen des Generationszyklus bekannt war (siehe C, VI, 2 + 3). Danach ergeben sich für die Generationszeiten die Werte 19,2 und 19,0 Stunden. Diese stehen in guter Übereinstimmung mit dem oben aus dem Ergebnis der Zellzählung berechneten Wert.

Bei Kenntnis der Generationszeit und der Zellzahlen/Rouxflasche bei 0 und 8 h läßt sich nach $Z_t = Z_0 \times 2^{\frac{t}{T}}$ die Zellzahl zu den verschiedenen Entnahmezeiten und durch Integration die mittlere Zellzahl in den Intervallen zwischen den Entnahmen berechnen (siehe LENNARTZ und MAURER, 1964). Nach diesen Ergebnissen wurden die ermittelten Werte (die ^3H -Aktivität des CdR und seiner Abbauprodukte als Prozentsatz der Ausgangsaktivität des Mediums, die prozentualen Anteile der Gesamtaktivität und der nichtflüchtigen Aktivität) auf eine "steady-state-Situation" mit der Zellzahl von $3,19$ bezogen, die zu Beginn des Versuchs vorlag. Die Darstellung bezieht sich auf ein konstantes Volumen des Nährmediums von 80 ml, das zu Versuchsbeginn eine CdR-Konzentration

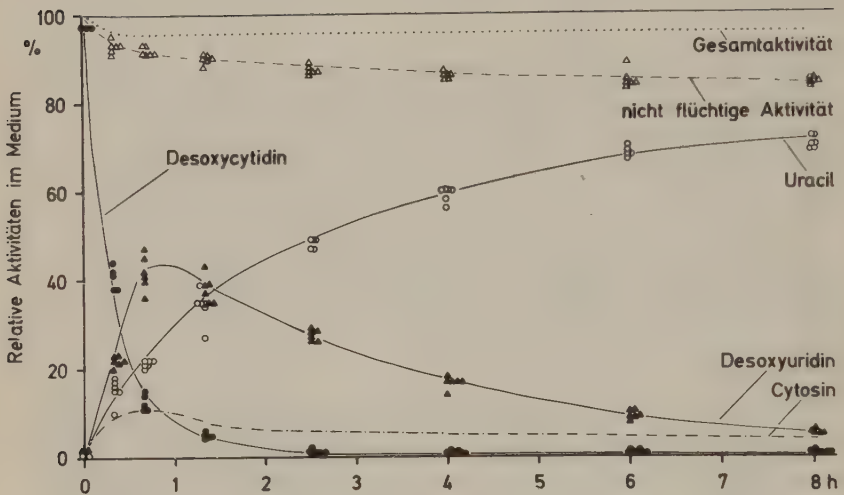


Abbildung 12

Prozentsatz von ^3H -CdR-(G) und seiner Abbauprodukte im Kulturmedium von HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Inkubation von ^3H -CdR-(G).

Die einzelnen Punkte stellen die Ergebnisse von 6 verschiedenen Kulturen dar. Zellzahl/Roux-Flasche zu Versuchsbeginn ca. $3,2 \times 10^7$ Zellen; 80 ml Medium/Roux-Flasche; CdR-Konzentration: 0,782 $\mu\text{g/ml}$; Aktivität: 1,02 $\mu\text{C/ml}$ (spezif. Aktivität: 295 mC/mMol). Die Werte sind bezogen auf eine gleichbleibende Zellzahl von $3,2 \times 10^7$ Zellen während des gesamten Versuchszeitraumes ("steady-state"-Situation) und auf ein konstantes Volumen von 80 ml/Kultur.

(Aus: MÜLLER und RATHENBERG, 1967)

von $0,78_2 \mu\text{g/ml}$ aufwies. Die Gesamtaktivität des Mediums fiel zunächst rasch, um ca. 5 %, danach jedoch langsamer ab. Sie betrug am Ende des Versuchs nach 8 Stunden noch 93,8 %. Diese Abnahme ist zu erklären mit der Inkorporation des CdR sowie seiner Abbauprodukte in die DNS und RNS. Der Anteil der nichtflüchtigen Gesamtaktivität nahm zunächst rasch, später aber bis zum Versuchsende, nur noch geringfügig ab. Die Ergebnisse zeigten innerhalb der ersten 20' einen Abfall der nichtflüchtigen Aktivität auf 92,5 %, nach weiteren 20' auf 90,7 %. Sodann vollzog sich der Abbau langsamer. Um 8 h betrug der Anteil der nichtflüchtigen Aktivität noch 69,3 %.

Der Abbau des CdR vollzog sich sehr rasch. Bereits nach 20 Minuten war es um mehr als die Hälfte, nach 2 1/2 Stunden auf ca. 2 % seiner ursprünglichen Menge reduziert. Gleichzeitig mit der Abnahme des CdR erfolgte umgekehrt ein nahezu ebenso rascher Anstieg des Desoxyuridins; jedoch erreichte sein Anteil an der Gesamtmenge des CdR und seiner Abbauprodukte nur ca. 40 %. Nach einer Versuchszeit von ca. 40 Minuten nahm sein Anteil langsam und kontinuierlich bis zur 8. Stunde wieder ab. Zu diesem Zeitpunkt war es noch mit etwa 6 % an den Abbauprodukten beteiligt. Als zweites Abbauprodukt kam Uracil hinzu, dessen Anteil nach 40 Minuten über 20 % erreichte. Sein Anteil nahm nahezu kontinuierlich bis etwa zur 8. Stunde zu. Zu diesem Zeitpunkt war es mit 80 % an den Abbauprodukten beteiligt. Demgegenüber trat das Cytosin anteilig nur in geringer Menge auf. Nach 40 Minuten erreichte sein Anteil mit ca. 10 % den Höchstwert, wonach wieder ein geringer Abfall eintrat. Zu Versuchsende waren noch ca. 3 % anteiliges Cytosin vorhanden. Auf eine Darstellung des Thymins, das anteilig bis zu knapp 4 % erreichte, wurde verzichtet. Von TdR, dUMP, TMP sowie dCMP konnten nur Tracer ermittelt werden.

V. Untersuchungen zur Pool-Bildung nach ^3H -Thymidin- und
=====
 ^3H -Desoxycytidin-Inkubation
=====

Bei Untersuchungen mit ^3H -TdR, insbesondere bei der sogenannten "Puls-Markierung", muß die mögliche Bildung eines TdR-Phosphat-Pool'es berücksichtigt werden, aus dem auch nach der Beendigung der Inkubation ein weiterer Einbau in die DNS erfolgen kann. Entsprechende Feststellungen machten unter anderem PAINTER und DREW (1959) an HeLa-Zellen sowie GALL und JOHNSON (1960) an den Samenkanälchen der Maus. Ausführliche Untersuchungen über die Bildung eines derartigen Pools bei L-Zellen wurden von CLEAVER und HOLFORD (1965) durchgeführt.

Die Inkorporation von ^3H -Thymidin in die DNS findet nach schrittweiser Phosphorylierung des Thymidins bis zum Thymidintriphosphat statt. Die Speicherung dieser Phosphate in einem säurelöslichen Pool ist von CRATHORN und SHOOTER (1960), von RIGAL (1961) sowie von FEINENDEGEN und BOND (1962) beschrieben worden. Der Zellkern wurde als der Ort dieser Pool-Bildung festgestellt. (RIGAL, 1961; FEINENDEGEN und BOND, 1962).

Setzt man die Möglichkeit der Bildung eines Phosphat-Pool'es aus dem verabreichten ^3H -Thymidin voraus, so erhebt sich die sehr wichtige Frage, zu welchem Zeitpunkt er während des Generationszyklus der Zellen entsteht. Die DNS-Synthese findet nur innerhalb eines Bruchteiles des Generationszyklus statt. Bei rasch proliferierenden HeLa-Zellen nimmt die DNS-Verdoppelungszeit ca. $1/2$ der Gesamtdauer des Generationszyklus in Anspruch. Die natürliche Thymidinphosphatbildung könnte entweder lediglich auf die Dauer der DNS-Synthese beschränkt sein, oder aber bereits vor der DNS-Synthese-Phase stattfinden. Bei der Verabreichung des fertigen Vorläufers Thymidin wäre es denkbar, daß die Aufnahme und Lagerung in einem Phosphat-Pool entweder ebenfalls auf den Zeitraum der unmittelbaren Verwertbarkeit, also auf die DNS-Synthese-Phase, beschränkt sei, oder aber sie könnte während eines

weiteren Zeitraumes vor Beginn der S-Phase erfolgen.

Von LARK (1963) wurde in ausführlicher Weise die Bedeutung der DNS-Vorläufer für die Kontrolle der DNS-Synthese dargelegt. Danach verläuft die Synthese der DNS-Vorläufer mit der Synthese der DNS synchron. Die Beobachtungen von STONE, MILLER und PRESCOTT (1965) bei der DNS-Synthese des Großkernes von Tetrahymena pyriformis stellen eine Bestätigung^{dar}. Mit Hilfe einer autoradiographischen Methode zum Nachweis wasserlöslicher Substanzen konnten sie zeigen, daß die Zellen während der G1- und der G2-Phase ^3H -TdR weder aufnehmen, noch zurückhalten. Das ^3H -TdR wurde lediglich nahe dem Beginn oder während der DNS-Synthese in den löslichen Pool aufgenommen. Auch die Ergebnisse früherer Untersuchungen (BOLLUM, POTTER, 1959; WEISSMANN, SMELLIE, PAUL, 1960; HOTTA, STERN, 1963) sprechen dafür, daß das Thymidin-phosphorylierende Enzym Thymidinkinase erst mit dem Beginn der DNS-Verdoppelungsphase synthetisiert wird.

An HeLa-Zellen wurden entsprechende Untersuchungen zur Pool-Bildung von Derivaten des TdR durchgeführt. Es wurde geprüft, ob diese Pool-Bildung auf die DNS-Synthese-Phase beschränkt ist. (MÜLLER, 1966).

In Leightonröhrchen ausgesäte HeLa-Zellen erhielten am Tage nach ihrer Aussaat 3-H-TdR ($0,5 \mu\text{C}/\text{ml}$, spezifische Aktivität $250 \text{ mC}/\text{mMol}$) für genau 30 Minuten. Die TdR-Konzentrationen entsprachen demnach $0,45 \mu\text{g}/\text{ml}$. Nach dreimaliger vorsichtiger (!) Waschung mit BSS (37°C) wurden die Zellen entweder sofort (Zeitpunkt Null) oder nach Verbleib in TdR-freiem Medium fixiert. Es wurden Autoradiogramme hergestellt und die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) sowie der 3-H-Index (Prozentsatz DNS-synthetisierender Zellen) bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 dargestellt. Die SkZ/mK nahm nach Verbleib in TdR-freiem Medium bis etwa zur 2. Stunde nach dem Ende der radioaktiven Versuchszeit um etwa 65 % zu. Ebenso stieg der ^3H -Index bis zur 2. Stunde an. Die Differenzen zwischen dem ^3H -Index zum Zeitpunkt Null (46,6 %, Zahl der untersuchten Präparate (n) = 8) einerseits sowie bei 2 h (53,0 %, n = 5) und bei 3 h (50,5 %, n = 8) andererseits erwiesen sich mit dem X-Test (Anordnungstest) (van der WAERDEN und NIEVERGELT, 1956) als stark gesichert.

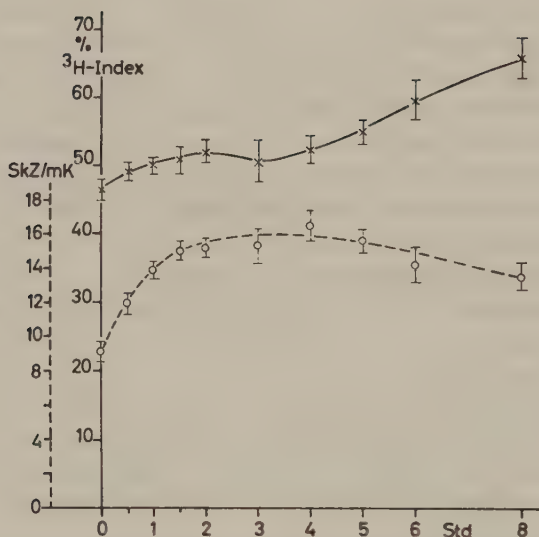


Fig. 1. Zeitlicher Verlauf des ^3H -Index (= ausgezogene Kurve) und der mittleren Silberkornzahl (umgerechnet auf eine Expositionszeit von 1 d) über den markierten Kernen (= gestrichelte Kurve) von HeLa-Zellen nach einer Puls-Markierung mit ^3H -Thymidin von 30 min Dauer. Abszisse: Zeit nach ^3H -Thymidin-Inkubation

Abbildung 13: aus MÜLLER (1966, b)

Es erhebt sich die Frage, ob eine Erhöhung des ^3H -Index, wie sie zur 2. und 3. Stunde gefunden wurde, durch eine Teilung markierter Zellen bedingt sein kann. Wie nachfolgend dargelegt werden soll (VI, 2 + 3), beträgt die Mitosedauer bei den HeLa-Zellen 0,8 h, die mittlere Dauer der G_2 -Phase 3,1 h, die minimale Dauer der G_2 -Phase 1 h. Somit ist also damit zu rechnen, daß bereits nach 1,8 h einige markierte Zellen die Mitose durchlaufen haben. Andererseits jedoch ist nach den Ergebnissen von VI, 2 + 3 sicher, daß bis zu 3,9 h nach Beginn der Inkubation vorwiegend noch nicht markierte Zellen das Ende der Mitose erreicht haben. Berechnungen haben ergeben, daß bis zu diesem Zeitpunkt der Prozentsatz der markierten Zellen (^3H -Index) abnehmen mußte.

Es wurde daher der Prozentsatz markierter Mitosen nach dem in VI, 1 + 2 dargelegten Verfahren bei 2 h und 3 h (d.h. also bei 2,5 und 3,5 h nach Beginn der Inkubation) überprüft. Dieser betrug bei 2,5 h = 18 %, bei 3,5 h 50 %. Die Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die bei Anwendung der "Prozent-markierten-Mitosen-Methode" (VI, 2) ermittelt wurden.

Vor der Bewertung der Ergebnisse wurden noch folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen:

Die dreimalige Spülung bei dem Mediumwechsel könnte ein Abschwimmen der in der Mitosephase befindlichen kugeligen Zellen, die zu diesem Zeitpunkt nur locker am Glas haften, zur Folge gehabt haben. Daher wurde der Mitoseindex zum Zeitpunkt Null und bei 3 h verglichen. Hier ergaben sich keine Differenzen. (Oh = 2,83 %; 3 h = 2,81 %, ohne Berücksichtigung der Prophasen.) Weiterhin wäre eine mögliche Abgabe des Vorläufers durch Kerne, die sich während der Inkubation in der DNS-Synthese-Phase befanden und ^3H -Thymidin aufnahmen, zu bedenken. ^3H -Aktivitätsmessungen des nachträglich verabreichten inaktiven Mediums ergaben jedoch nur ^3H -Aktivitäten, die unter 0,2 % der Aktivität des ^3H -TdR-haltigen Mediums lagen.

Nach diesen Ergebnissen bilden die in der DNS-Synthese-Phase befindlichen HeLa-Zellen einen Pool von TdR-Derivaten. Hierin besteht Übereinstimmung mit den Befunden von PAINTER und DREW (1959) an dem gleichen Zellsystem sowie auch mit denen der

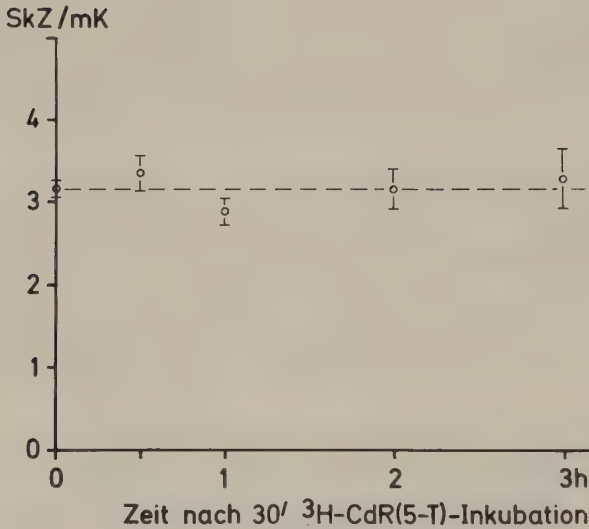


Abbildung 14

Untersuchungen zur Bildung eines Pools von CdR-Phosphaten

Zeitlicher Verlauf der SkZ/mK nach einer Puls-Markierung mit ^3H -CdR-(5-T) von 30 Minuten Dauer ($1,0 \mu\text{C/ml}$, spez. Aktivität 500 mC/mMol). Abszisse: Zeit nach Beendigung der ^3H -CdR-Inkubation (MÜLLER und ROCKER, 1967).

anderen Autoren an verschiedenstem Zellmaterial. Die Erhöhung des ^3H -Index legt jedoch nahe, daß ^3H -TdR nicht nur während, sondern auch bereits vor der S-Phase aufgenommen wird, wobei es sich ebenfalls um eine Pool-Bildung handeln dürfte. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Auffassung, daß die DNS-Synthese synchron mit der Vorläufersynthese verlaufe (siehe LARK, 1963; STONE, MILLER und PRESCOTT, 1965 etc.). Ihm sind jedoch keine Untersuchungen an cancerisierten - insbesondere über sehr lange Zeit in vitro gehaltenen - Zellen gegenüberzustellen. Es muß daher zunächst als möglich angesehen werden, daß bei dem untersuchten Zellsystem andere Voraussetzungen vorliegen.

In entsprechender Weise wie beim Thymidin wurde auch mit ^3H -CdR-(5-T) die Möglichkeit einer Pool-Bildung von Phosphaten des Desoxycytidins untersucht.

Die Versuchsdurchführung entsprach jener bei der Untersuchung des Pools von TdR-Derivaten. Die Zellen erhielten für die Dauer von 30 Minuten ^3H -CdR-(5-T) ($1,0 \mu\text{C}/\text{ml}$ Medium, spezifische Aktivität $500 \text{ mC}/\text{mMol}$). Die CdR-Konzentration glich somit der Konzentration des TdR im oben beschriebenen Versuch. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 30 Minuten, 1, 2 und 3 Stunden. Durch Silberkornauszählungen wurde die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) bestimmt.

Die in der Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß eine Pool-Bildung nach ^3H -CdR-(5-T)-Verabreichung nicht festzustellen ist. Nach den oben dargelegten Befunden (C, II, 2, c) wird ^3H -CdR-(5-T) im Vergleich zu dem ^3H -TdR nur zu einem Bruchteil in die DNS eingebaut. Die biochemischen Untersuchungen (C, IV, 2) zeigten einen im Vergleich zum TdR sehr raschen Abbau. Nach diesen Ergebnissen ist das Ausbleiben einer Pool-Bildung von Phosphaten des CdR verständlich.

VI. Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Synthese-
Phase und der anderen Teilphasen des Generationszyklus von He-
La-Zellen
=====

1. Der Generationszyklus und seine Teilphasen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde über die Inkorporation der ^3H -markierten Vorläufer Thymidin und Desoxycytidin in die DNS berichtet. Die Silberkornzahl galt dabei als ein relatives Maß der Inkorporation des Vorläufers. Wie später dargelegt werden soll, ist die Silberkornzahl jedoch auch als ein absolutes Maß der inkorporierten Menge eines verabreichten Vorläufers verwertbar. Will man z.B. ermitteln, in welchem Verhältnis ein verabreichter Vorläufer an Stelle des natürlich synthetisierten Vorläufers in die DNS eingebaut wird, so ist die Kenntnis weiterer Größen, u. a. der Dauer der DNS-Synthese-Phase, erforderlich.

Zur Zellteilung befähigte Zellen durchlaufen einen Generationszyklus, der in vier Phasen unterteilt werden kann:

1. die präsynthetische, postmitotische Ruhephase, die sog. " G_1 -Phase", 2. die Phase der DNS-Neubildung, die sog. "S-Phase", 3. die postsynthetische oder prämitotische Ruhephase, die sog. " G_2 -Phase", 4. die Mitose (siehe Abbildung 15). Dies trifft zu für die verschiedensten Zellarten sowohl tierischer als auch pflanzlicher Art. Die Dauer der einzelnen Phasen, besonders jedoch der S-Phase, kann von Zellsystem zu Zellsystem variieren. Die Existenz eines derartigen Zyklus ist insbesondere durch Zuhilfenahme der autoradiographischen Technik aufgedeckt worden. (Lit. siehe bei: QUASTLER und SHERMAN, 1959; STANNERS und TILL, 1960; KOBURG und MAURER, 1962; LENNARTZ und MAURER, 1964; CAIRNIE, LAMERTON und STEEL, 1965 a, b; ALTMANN, 1966).

Die Dauer der S-Phase wie auch der anderen Teilphasen kann durch Zuhilfenahme zweier Methoden ermittelt werden. 1. Durch Bestimmung des Prozentsatzes markierter Mitosen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer einmaligen Gabe von ^3H -Thymidin (sog. "Prozent-markierter-Mitosen-Methode") (siehe QUASTLER und SHERMAN, 1959; KOBURG und MAURER, 1962). 2. Durch Anwendung eines Doppel-

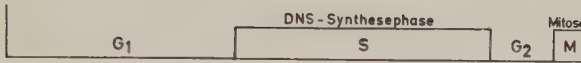


Abbildung 15: Die Teilphasen des Generationszyklus

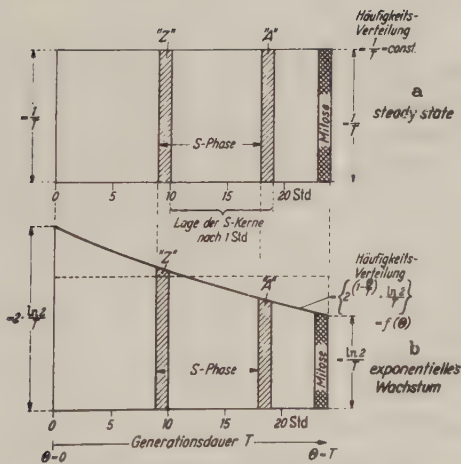


Abb. 1a u. b. Häufigkeits-Verteilung der Zellen über den Generationszyklus für eine Population im „steady state“ (a) und im Stadium des exponentiellen Wachstums (b). (Population mit der Zellzahl $Z_0 = 1$)

Abbildung 16: aus LENNARTZ und MAURER (1964)

markierungsverfahrens, wobei zeitlich aufeinanderfolgend zwei Gaben von radioaktiv markiertem Thymidin verabreicht werden, eine erste Gabe von ^3H -Thymidin und nachfolgend eine zweite Gabe von ^{14}C -Thymidin oder wiederum ^3H -Thymidin einer vielfachen Aktivität (siehe HILSCHER und MAURER, 1962; WIMBER und QUASTLER, 1963; PILGRIM und MAURER, 1963).

Die bisherigen Untersuchungen der S-Phase führten überraschenderweise bei vielen normalen und auch cancerisierten Zellen von Warmblütern zu Werten ähnlicher Größe. Ebenso ergaben sich ähnliche Werte für die Dauer der postsynthetischen oder prämitotischer Ruhephase, der " G_2 -Phase" (siehe KOBURG und MAURER, 1962; LENNARTZ und MAURER, 1964). Hingegen stellte sich heraus, daß die Gesamtdauer des Generationszyklus in weiten Grenzen variieren kann. Die Unterschiede in der Dauer des Generationszyklus sind dann im wesentlichen auf die unterschiedliche Länge der G_1 -Phase zurückzuführen.

Untersuchungen über die Generationszeit und die Dauer der Teilphasen von HeLa-Zellen wurden bereits durchgeführt von PAINTER und DREW (1959) sowie von SEEMAYER, HAAS und MAASS (1966). Diese erfolgten durch die Anwendung der "Prozent-markierter-Mitosen-Methode". Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der

Tabelle 3

Untersucher	Serumgehalt des Mediums	Gener.-Zeit	S-Phase	G_2 -Phase
PAINTER und DREW (1959)	10 % Pferdeserum	28 h	8,5 h	3 - 8 h
PAINTER und DREW (1959)	15 % Kälberserum	25 h	8-10 h	1 - 3 h
SEEMAYER et al. (1966)	5 % Kälberserum	24 h	8-8,8 h	ca. 2 h

zusammengestellt. Ergänzend ist hierzu zu bemerken, daß sich die Medien auch noch in anderer Hinsicht in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. So verwendeten PAINTER und DREW (1959) EAGLE's Basalmedium, SEEMAYER et al. (1966) dagegen 0,5%iges Lactalbuminhydrolysat in HANKS-Lösung (siehe B, 1). Es ist zu vermuten,

daß Unterschiede der Dauer der S-Phase und der G_2 -Phase durch verschiedene Medienzusammensetzungen bedingt sein können. Das war der Anlaß zur Bestimmung der Dauer der Einzelphasen des eigenen Zellsystems, das über mehrere Jahre hinweg unter gleichbleibenden Bedingungen gehalten wurde (siehe B, 1).

Die Untersuchung des Generationszyklus der HeLa-Zellen wurde unter Anwendung der beiden genannten Methoden durchgeführt.

2. Die Bestimmung der S-Phase und der anderen Teilphasen des Generationszyklus mit der "Prozent-markierter-Mitosen-Methode"

In der üblichen Weise ausgesäte HeLa-Zellen (2×10^4 Zellen/ml; 1,5 ml/Leightonröhrchen) wurden am Tage nach der Aussaat für die Dauer von genau 30' in 3-H-TdR-haltigem Medium ($0,2 \mu\text{C}$ 3-H-TdR/ml; spezifische Aktivität 5000 mC/mMol) inkubiert. Nach beendeter Inkubation erfolgte eine vorsichtige Waschung mit BSS. Sodann erhielten die Zellen das sog. "Fütterungsmedium" (siehe B, 1) mit 10 % Kälberserum. Die Fixierung erfolgte zu verschiedenen Zeiten zwischen 1 und 26 Stunden nach Beginn der Inkubation (nach 1, 2, 3 und 4 Stunden und bis 26 h in zweistündigen Abständen). Nach der üblichen Präparation wurden Autoradiogramme hergestellt. Der Prozentsatz der markierten Mitosen wurde durch Auszählung von jeweils 500 Mitosen/Präparat bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden 5 Präparate ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit Ölimmersion 100 x. Der 3-H-Index wurde ermittelt an Präparaten, die 1 h nach Inkubationsbeginn fixiert worden waren. Die Bestimmung des Mitoseindex geschah an den gleichen Präparaten sowie an solchen, deren Fixierung 8 Stunden nach Inkubationsbeginn erfolgte. Pro Präparat wurden hierzu 500 Mitosen ausgezählt.

Die Abbildung 17 zeigt die Kurve, die sich aus dem Prozentsatz markierter Mitosen bei verschiedener Versuchsdauer ergibt. Aus dem Kurvenverlauf kann auf die Dauer der G_2 - und der S-Phase geschlossen werden.

Die S-Phase: Eine Stunde nach Beginn der Inkubation betrug der Prozentsatz markierter Mitosen 1,9 %. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Prophasen. Sodann erfolgte ein rascher Anstieg dieses Prozentsatzes. 6 Stunden nach Inkubationsbeginn waren 98,5 % der Mitosen markiert, jedoch wurden bei einigen Präparaten schon 100 % markiert gefunden. Weiter ergaben sich die folgenden Werte: 8 h = 100 %, 10 h = 97,7 %, 12 h = 32,6 %, 14 h = 11,1 %. Demnach beginnt nach 10 h ein rascher Abfall des Prozentsatzes markierter Mitosen.

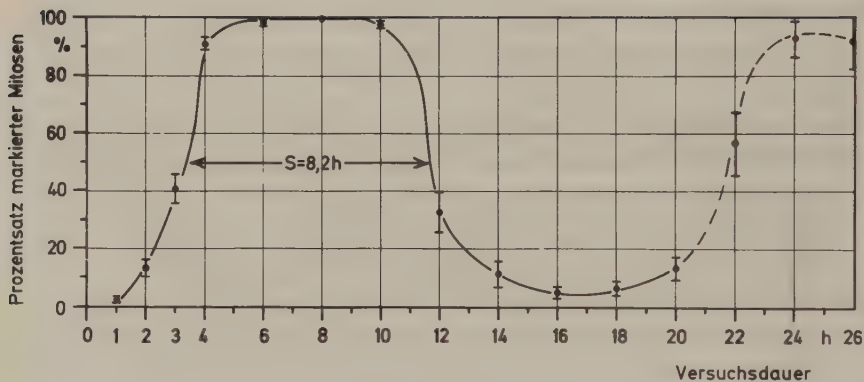


Abbildung 17

Prozentsatz markierter Mitosen bei HeLa-Zellen als Funktion der Versuchsdauer nach Beginn einer $1/2$ -stündigen ^3H -TdR-Inkubation.

Die Dauer der S-Phase ist abzuleiten aus der Breite der Kurve in der Höhe der 50%-Markierung. Danach beträgt die Dauer der S-Phase etwa 8,2 Stunden. Zwischen dem Beginn des Kurvenanstiegs bei 1 h und dem Beginn des Abfalles der Kurve, der etwa bei 9,5 h liegen dürfte, ergibt sich eine Zeitdifferenz von ca. 8,5 Stunden. Nach diesen Ergebnissen beträgt die Dauer der S-Phase etwa 8,2 bis 8,5 Stunden. Diese geringen Zeitdifferenzen lassen den Schluß zu, daß keine stärkeren Schwankungen der S-Phase bestehen.

Die G₂-Phase: Die ersten markierten Mitosen wurden bei 1 h gefunden. Diese Zeit entspricht der geringsten Dauer der G₂-Phase, G₂ min. = 1 h. Die Zeit bis zum Erreichen des 100 % Wertes entspricht G₂ + M. Sie beträgt hier etwa 6 h. Die Mitosedauer wurde, wie weiter unten dargelegt werden soll, mit 0,8 Stunden bestimmt. Demnach ergibt sich eine maximale Dauer der G₂-Phase (G₂ max.) von 5,2 h. Bei den Schwankungen von 1,0 bis 5,2 h erhält man ein G_{Mittel} = 3,1 h. Man erwartet, daß bei einer Zeit von G_{Mittel} und der halben Mitosedauer (G₂ Mittel + M/2 = 3,5 h) etwa 50 % der Mitosen markiert sind. Das trifft nach dem Kurvenverlauf weitgehend zu.

Die Generationszeit: Sie kann ermittelt werden aus dem ³H-Index (Prozentsatz der markierten Kerne) bei einer bekannten Dauer der S-Phase (siehe LENNARTZ und MAURER, 1964; WEGENER, HOLLWEG und MAURER, 1964). Es gilt demnach das Verhältnis:

$$\frac{{}^3\text{H-Index}}{100} = \frac{\text{S-Phase}}{\text{Generationszeit}}$$

Dieses trifft jedoch nur für eine Population im "steady state" zu. Bei einem exponentiellen Wachstum liegen andere Verhältnisse vor. Das ist ersichtlich aus der Abbildung 16, die für beide Situationen die Häufigkeitsverteilung der Zellen über dem Generationszyklus zeigt. Daraus geht hervor, daß die Häufigkeit der Zellen pro Zeitelement beim "steady state" unveränderlich ist, beim exponentiellen Wachstum dagegen zur Mitose hin abnimmt.

Auch im Falle eines exponentiellen Wachstums kann die Generationszeit bei Berücksichtigung der Häufigkeitsverteilung aus dem ³H-Index berechnet werden, wenn die Dauer der S-Phase sowie von G₂ + M bekannt sind. Im vorliegenden Fall betrug der ³H-Index

45,1. Danach ergab sich bei einer Dauer der S-Phase von 8,3 h (siehe unten) und einer Dauer von $G_2 + M = 3,9$ h für den vorliegenden Fall eine Generationszeit von 18,3 h.

Die Generationszeit ist im wesentlichen bestimmt von der Dauer der G_1 -Phase. Die Dauer von $S + G_2 + M$ können dagegen als weitgehend konstante Größen gelten (CATTANEO, QUASTLER und SHERMAN, 1961; DEFENDI und MANSON, 1963; PILGRIM, 1963; LENNARTZ und MAURER, 1964). Das darf auch als zutreffend angesehen werden für ein in-vitro-Zellsystem, das über lange Zeit unter gleichbleibenden Kulturbedingungen gehalten wird. Eine Verlängerung der Generationszeit ist demnach bedingt durch eine Vergrößerung von G_1 . Die Verlängerung der G_1 -Phase bei Konstanz von $S + G_2 + M$ muß notwendigerweise zu einer Verkleinerung des " ^3H -Index" führen. Entsprechende Beobachtungen sind auch bei Zellkulturen mit zunehmender Zelldichte in einem geschlossenen Zellrasen zu machen.

Die Abbildung 18 stellt die Beziehung zwischen dem Prozentsatz der in der S-Phase befindlichen Kerne und der Generationszeit bei den gegebenen Werten von $S = 8,3$ h und $G_2 + M = 3,9$ h für ein exponentielles Wachstum dar. Hier wurde der Prozentsatz der S-Phasen-Kerne für eine Generationszeit von 16 - 30 Stunden berechnet. Bei den dargelegten Versuchen allerdings, die an Kulturen mit nicht geschlossenem Zellrasen durchgeführt wurden, betrugen die Generationszeiten etwa 17,5 bis 19 Stunden.

Der " ^3H -Index", der Prozentsatz der markierten Kerne im Autoradiogramm, ist streng genommen nicht identisch mit dem Prozentsatz der in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne. Seine Größe ist weiterhin abhängig von der gewählten Inkubationszeit und nimmt mit dieser zu. Während der Inkubationszeit wandern Zellen aus der G_1 -Phase in die S-Phase zu; ebenso wandern im gleichen Zeitraum markierte Zellen aus der S-Phase aus und gelangen in die G_2 -Phase. Das wird ersichtlich aus der Abbildung 16. Der ^3H -Index gibt demnach stets einen größeren Wert als den Prozentsatz der jeweils in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne an. In der Abbildung 18 ist der ^3H -Index für die gleichen Verhältnisse entsprechend einer Inkubationszeit von 60' dargestellt (unterbrochene Kurve).

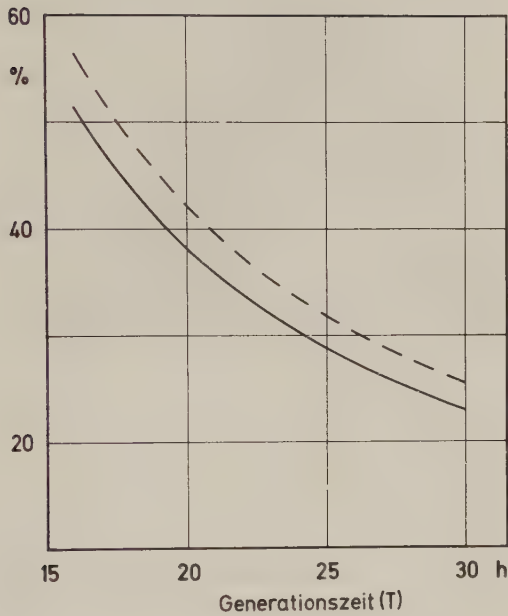


Abbildung 18

Zusammenhang zwischen der Größe des " ^3H -Index" bzw. dem Prozentsatz der S-Phasenkerne und der Generationszeit. Berechnet für die Teilphasen $S = 8,3$ h, $G_2 = 3,1$ h und $M = 0,8$ h. Durchgezogene Kurve: Prozentsatz der S-Phasenkerne, unterbrochene Kurve: ^3H -Index = Prozentsatz der markierten Kerne nach einstündiger ^3H -TdR-Inkubation.

Die Mitose-Phase: Die Dauer der Mitose-Phase wurde ermittelt aus dem "Mitose-Index" (= Prozentsatz der Mitosen bezogen auf die Gesamtzahl der ausgezählten Zellen). Auch hier ist die Tatsache zu berücksichtigen, daß ein exponentielles Wachstum vorliegt. Bei bekannter Generationszeit ist die Mitose-Dauer durch folgende Beziehung zu berechnen:

$$\text{Mitose-Dauer (M)} = \frac{\text{Generationszeit} \times \text{Mitose-Index } \%}{100} \times \frac{1}{\ln 2}$$

Bei einem Mitose-Index von 3,15 und einer Generationszeit von 18,3 ergab sich eine Mitose-Dauer von 0,83 h.

3. Die Bestimmung der Dauer der S-Phase durch Anwendung der Doppelmarkierungsmethode

In der üblichen Weise in Leightonröhrchen ausgesäte HeLa-Zellen wurden am Tage nach der Aussaat für 65 Minuten in 3-H-TdR-haltigem Medium (0,01 µC/ml, spezifische Aktivität 13000 mC/mMol) inkubiert. Nach rascher Entfernung des Mediums folgte die Inkubation in 3-H-TdR-haltigem Medium, das die 20-fache Aktivitätsmenge enthielt (0,2 µC/ml Medium, gleiche spezifische Aktivität). Die Inkubationszeit betrug jetzt 40 Minuten. Danach wurden die Zellen fixiert und Autoradiogramme nach der üblichen Präparation hergestellt.

Bei der 1. Inkubation (³H-Thymidin einfach) werden alle Kerne, die sich während dieser Zeit in der S-Phase befanden, "schwach" markiert. Während der nachfolgenden Inkubation (³H-Thymidin 20-fach) werden dagegen die während dieses Zeitraumes in der S-Phase befindlichen Kerne "stark" markiert. Da während der 1. Inkubation ein Teil der Kerne in die G₂-Phase einwandert, bleibt dieser "schwach" markiert. Die "schwache" Markierung des zu Beginn der 2. Inkubation in der S-Phase verbliebenen Teiles der Kerne wird durch die "starke" Markierung überdeckt.

In den Autoradiogrammen waren "stark" und "schwach" markierte Kerne gut voneinander zu unterscheiden (siehe Abbildung 19). Die Auswertung erfolgte durch Auszählung von jeweils 2000 "stark" und "schwach" markierten Kernen in 5 Präparaten. Es ergab sich das Verhältnis "stark" zu "schwach" markierten Kernen von 10,2₃ : 1. Aus diesem ist die Dauer der S-Phase er-rechenbar nach:

$$\frac{\text{Zahl der "stark" mark. Kerne}}{\text{Zahl der "schwach" mark. Kerne}} = \frac{\text{Dauer der S-Phase}}{\text{Zeitintervall zwischen d. beiden Inkubationen (= 65 Minuten)}}$$

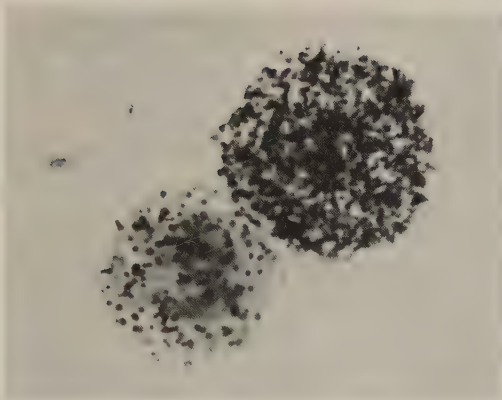


Abbildung 19

Doppelmarkierung mit ^3H -TdR und ^3H -TdR-20-fach zur Bestimmung der Dauer der S-Phase der HeLa-Zellen

1. Markierung: ^3H -TdR, 0,01 $\mu\text{C}/\text{ml}$ Medium (spez. Aktivität 13000 mC/mMol), Inkubationszeit: 62 Minuten.

2. Markierung: 0,2 $\mu\text{C}/\text{ml}$ Medium (gleiche spez. Aktivität), Inkubationszeit: 40 Minuten.

"Schwach" markierter Kern infolge der 1. Markierung (1-fach) und

"stark" markierter Kern infolge der 2. Markierung (20-fach).

Danach ergibt sich eine Dauer der S-Phase von 11,09 h. Dieses Ergebnis bedarf jedoch einer Korrektur: Der gefundene Wert von 11,09 Stunden trifft nur für den Fall eines "steady state" zu. Im vorliegenden Versuch lag jedoch ein "exponentielles Wachstum" vor. Während der beiden Inkubationszeiten traten jeweils ein Teil der markierten Kerne aus der S-Phase aus, andere Kerne traten aus der G_1 -Phase in die S-Phase über. Aus der Abbildung 16 wird verständlich, daß die Zahl der aus der S-Phase auslaufenden Kerne "A" geringer ist als die Zahl der zulaufenden Kerne "Z".

LENNARTZ und MAURER (1964) haben ein für diesen "Extremfall" des exponentiellen Wachstums zutreffendes Korrekturverfahren der "schrittweisen Näherung an eine steady-state-Situation" ausgearbeitet. Bei der Kenntnis der Dauer der Mitose- und der G_2 -Phase (siehe VI, 2) sowie des 3H -Index, der im vorliegenden Falle 51,8 % betrug, konnte dieses Korrekturverfahren angewandt werden (Korrekturfaktor 0,75). Danach betrug die Dauer der S-Phase der HeLa-Zellen 8,3₅ Stunden.

Den späteren Berechnungen wurde nun unter Berücksichtigung der beiden Ergebnisse, die durch Anwendung der "Prozent-markierter-Mitosen-Methode" und der "Doppelmarkierung" gewonnen wurden, eine Dauer der S-Phase von 8,3 h zugrunde gelegt.

VII. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes sowie des Trockengewichtes =====

von HeLa-Zellen =====

1. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes

In Roux-Flaschen ausgesäte HeLa-Zellen (ca. 10^5 Zellen/ml Medium; 100 ml Medium/Roux-Flasche) wurden am 1. Tage nach der Aussaat "gefüttert" und am 2. Tage für 60 Minuten in 3-H-TdR-haltigem Medium inkubiert (0,1 μC /ml; spezifische Aktivität 1300 mC/mMol). Danach erfolgte die Ernte durch Anwendung von Versenlösung (siehe VIII/2). Nach der Zentrifugation wurde das Sediment in NaCl-Phosphat-Puffer aufgenommen und durch ständiges Rühren eine homogene Suspension hergestellt. Durch Zellzählung in einer Neubauer-Kammer (> 10.000 Zellen) erfolgte die Bestimmung der Zellzahl/Volumeneinheit der Suspension. Die gewonnene Gesamtzellzahl betrug $1,36 \times 10^8$ Zellen. Um einen Verlust der DNS-Menge infolge der Präparation genau bestimmen zu können,

wurde einerseits die spezifische Aktivität der DNS sowie andererseits die 3-H-Aktivität der DNS einer bekannten Zellzahl untersucht, was auf folgende Weise geschah:

Zunächst sind von der vorliegenden Suspension 10×5 ml in Zentrifugenröhrchen eingebracht worden. Die Sedimente wurden mit CARNOY'scher Flüssigkeit fixiert. Sodann erfolgten zur Beseitigung säurelöslicher, nicht in die DNS eingebauter Derivate des 3-H-TdR nach jeweiliger Zentrifugation die gleichen Waschungen, die auch vor der Herstellung der Autoradiogramme angewandt wurden (siehe B, 3, a). Danach wurden die Sedimente auf Filtrierpapier aufgetropft, verascht und ihre 3-H-Aktivität gemessen.

Der Hauptanteil der Suspension wurde zur Gewinnung der DNS verwendet: Zunächst erfolgte die Präparation reiner Zellkerne nach der von MARCUS, SAIB und SCHWARZ (1965) angegebenen Methode (genaue Darstellung siehe VII, 2) und danach die Isolierung der DNS nach der Technik von LUZZATI und NICOLAIEFF (1963). Das nach Zentrifugation gewonnene Sediment der reinen Zellkerne wurde in 1-molarer NaCl-Lösung aufgenommen und im Potter-Homogenisator zertrümmert. Das Homogenisat wurde in der 5-fachen Menge 0,15-molarer, eisgekühlter NaCl-Lösung verdünnt. Danach erfolgte die Zentrifugation der ausgefallenen DNS, die dann über Nacht in 1-molarer NaCl-Lösung gelöst wurde. Nach Bestimmung des Volumens der DNS-Lösung wurden Anteile davon auf Fließpapier aufgetropft und verascht und deren 3-H-Aktivität gemessen. Der größere Teil der DNS-Lösung wurde nach der Diphenylamin-Reaktion (DISCHE, 1930) zur photometrischen Bestimmung der DNS-Menge verwendet. Aufgrund des Verhältnisses der 3-H-Aktivität der gesamten DNS-Lösung zu der 3-H-Aktivität des gewaschenen Zellmaterials ließ sich der mittlere DNS-Gehalt der HeLa-Zellen errechnen. Der Berechnung der DNS-Menge wurde das von CHARGAFF und LIPSHITZ (1953) bei der Milz des Menschen bestimmte Basenverhältnis zugrunde gelegt.

Der mittlere DNS-Gehalt beträgt $1,47 \times 10^{-11}$ g / Zelle.

Bei diesem Wert handelt es sich um den mittleren DNS-Gehalt der Zelle einer im exponentiellen Wachstum befindlichen Population mit einer Generationszeit von ca. 18,5 h. Der Wert von $1,47 \times 10^{-11}$ g steht in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis einer anderen DNS-Bestimmung (siehe C, IV, 2), wobei die DNS-Extraktion nach der Methode von SCHNEIDER (1930) durchgeführt wurde. Der hierbei gefundene mittlere DNS-Gehalt betrug etwa $1,4 \times 10^{-11}$ g / Zelle.

2. Bestimmung des Trockengewichtes der Kerne und der Gesamtzellen

Die Bestimmung des Trockengewichtes der Gesamtzellen und der Kerne erfolgte an in Roux-Flaschen angezüchteten He-La-Zellen (Aussaat ca. 10^5 Zellen/ml; 100 ml/Roux-Flasche; Mediumwechsel am Tage nach der Aussaat). Geerntet wurde ein noch nicht geschlossener Zellrasen am 2. Tag nach der Aussaat, um eine im exponentiellen Wachstum befindliche Population zu erhalten. Die Zellen wurden durch Anwendung von Versen (ca. 30 ml/Roux-Flasche) bei einer Temperatur vom 37°C über eine Zeit von ca. 20 Minuten abgelöst.

(Versenlösung: Disodium-Dihydrogen-Versenat (Lieferfirma: "Nordwald-Labor", Hamburg) 0,02%ige Lösung in phosphat-gepufferter Kochsalzlösung ohne Magnesiumchlorid.) Das durch Zentrifugation gewonnene Zellsediment wurde in Natriumchlorid-Phosphat-Puffer aufgenommen und unter ständigem Rühren in einer gleichmäßigen Zellsuspension verteilt. Nach Feststellung der Zellzahl pro Volumeneinheit (Aus-zählung von > 10.000 Zellen in der Neubauer-Kammer) wurden zwei Teile aus der Suspension entnommen, ein größeres Vo-lumen zur Bestimmung des Trockengewichtes der Kerne und eine kleinere Menge zur Trockengewichtsbestimmung der Zellen. Zur Ermittlung des Trockengewichts der Gesamtzellen wurden die Zellen nach der Zentrifugation verlustlos zur Trocknung gebracht und gewogen.

Die Ermittlung des Trockengewichtes der Kerne hatte die Beseitigung des gesamten Cytoplasmas zur Voraussetzung. Die Präparation reiner Zellkerne erfolgte nach einer von MARCUS, SAIB und SCHWARZ (1965) beschriebenen Methode. Das gewonnene Sediment wurde in einer kalten 0,01%igen wäßri-gen Lösung von Dodecylsulfat-Natrium-Salz aufgenommen (SERVA-Entwicklungslabor, Heidelberg). Die Zellkonzentra-tion betrug ca. 2×10^6 Zellen/ml. Die Suspension wurde etwa 10 Minuten lang durch wiederholtes kräftiges Ansaugen mit einer 10ml-Pipette gut gemischt. Danach erfolgte Zen-trifugation und rasche Waschung des Sediments in NaCl-Phos-phat-Puffer. Die Trocknung des Sediments geschah zunächst im Trockenschrank, anschließend im Exsikkator. Die mikros-kopische Kontrolle gefärbter Tupfpräparate zeigte, daß mehr als 99,9 % der Kerne völlig frei von cytoplasmatischen Strukturen waren.

Ergebnisse: Gewicht der Gesamtzelle: $7,62 \times 10^{-10}$ g
Gewicht des Kernes: $8,1_0 \times 10^{-11}$ g

VIII. Die Bestimmung des Verhältnisses der radioaktiven Zerfälle

des Tritiums zur Silberkornzahl in den Autoradiogrammen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde über autoradiographi-sche Untersuchungen berichtet, bei denen die Inkorporationsver-hältnisse durch Silberkornauszählungen über den Kernen unter verschiedenen Bedingungen bestimmt worden waren. Es erhebt sich nunmehr die Frage, ob aus der Silberkornzahl auch absolute Werte

für die Inkorporation des verabreichten Vorläufers abgeleitet werden können. Hierfür sind zwei Voraussetzungen erforderlich; nämlich die Kenntnis der spezifischen Aktivität des Vorläufers sowie des Verhältnisses der Zahl der radioaktiven Zerfälle zur Silberkornzahl im Autoradiogramm. Die spezifische Aktivität kann im allgemeinen als bekannt vorausgesetzt werden. Das Verhältnis der Zahl der radioaktiven Zerfälle zur Silberkornzahl wurde bisher verschiedentlich schon untersucht (HUGHES et al., 1958; LAJTHA and OLIVER, 1959; WIMBER et al., 1960; KISIELSKI et al., 1961; MAURER und PRIMBSCH, 1964; CLEAVER and HOLFORD, 1965), jedoch sind die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die vorliegenden Versuchsbedingungen (Deckglaskulturen, AR 10-Stripping-Film) anwendbar.

Es wurde daher an Deckglaskulturen von HeLa-Zellen das Verhältnis der Zahl der β -Zerfälle zur Zahl der durch diese erzeugten Silberkörner unter Verwendung von AR-10-Stripping-Film "KODAK", London, untersucht.

In Leightonröhrchen gezüchtete HeLa-Zellen wurden am Tage nach der Aussaat für die Dauer von 60 Minuten in 3-H-TdR-haltigem Medium inkubiert ($0,081 \mu\text{C/ml}$, spezifische Aktivität 13.000 mC/mMol). Nach beendeter Inkubationszeit erfolgte die sofortige Fixierung mit Carnoy und die Anfertigung der Autoradiogramme mit AR 10 "stripping-film". Die Expositionszeit der getrockneten Autoradiogramme betrug genau 48 Stunden.

Die nachfolgenden Zählungen hatten die Bestimmung der gesamten Silberkornzahl im Autoradiogramm des die Zellen tragenden Deckglases zum Ziel. Hierzu mußten die mittlere Silberkornzahl über den markierten Kernen (SkZ/mK) festgestellt, der ^3H -Index (Prozentsatz der markierten Kerne) bestimmt und die Zellzahl auf dem $10 \times 30 \text{ mm}$ großen Deckglas ermittelt werden.

Die Bestimmung der mittleren Silberkornzahl erfolgte durch Auszählung von jeweils mindestens 4.000 Silberkörnern über jeweils 100 Kernen in 5 Präparaten. Der Nulleffekt ($< 2\%$) wurde in Abzug gebracht. Die mittlere Silberkorndichte lag bei etwa 44 Silberkörnern pro markiertem Kern. Die Differenzen in der mSkZ/mK waren bei den einzelnen Präparaten gering (siehe Tabelle 4). - Der 3-H-Index wurde durch Auszählung von jeweils 10.000 Zellen/Präparat ermittelt. - Die Bestimmung der Zellzahl pro Deckglas erfolgte auf folgende Weise: Es wurden die Zellen ausgezählt, die sich in dem auch für die Silberkornauszählungen verwendeten Planquadrat ($80 \times 80 \mu$ Seitenlänge) befanden. Hierzu wurde das Planquadrat auf den oberen linken Rand des Deckglases eingestellt. Die nachfolgenden Auszählungen erfolgten nach

jeweiliger Verschiebung des Objektes auf dem Kreutztisch in der Senkrechten um etwa 0,25 mm in insgesamt 36 verschiedenen Positionen. Diese Auszählungen wurden 58mal wiederholt nach jeweiliger Verschiebung des Objektes um 0,5 mm in der Waagerechten (insgesamt $36 \times 58 = 2.088$ Positionen). Die auf diese Weise ermittelte Zellzahl lag zwischen 9.370 und 16.000. Die Schwankungen der Gesamtzellzahl auf einem Deckglas sind damit zu erklären, daß sich gelegentlich ein Teil der Zellen unmittelbar nach der Aussaat neben dem Deckglas in der Wanne des Leightonröhrchens absetzen kann.

Nach erfolgter Bestimmung der SkZ/mK, des ^3H -Index und der Zellzahl pro Deckglas wurde das den Stripping-Film schützende Deckglas im Wasserbad abgelöst, der gesamte Zellrasen einschließlich des jetzt feuchten Strippings-Filmes mit einer Rasierklinge von seiner Unterlage abgeschabt und auf Filtrierpapier gebracht. Durch gründliches Abwischen des Deckglases und der Rasierklinge wurde ein Verlust von Zellen vermieden und die restlose Beseitigung der Zellen von ihrer Unterlage mikroskopisch kontrolliert. Das in Filtrierpapier gepackte Zellmaterial wurde in Sauerstoffatmosphäre restlos verbrannt und im Flüssigkeits-Scintillationszähler gemessen.

In der Tabelle 4 sind die ermittelten Werte dargestellt. Die Zahl der zur Erzeugung eines Silberkornes notwendigen Zerfallsprozesse betrug demnach 9,83 (St.Abw. 0,422).

Das Resultat von 9,8 Zerfällen/Silberkorn entspricht weitgehend den Ergebnissen von WIMBER, QUASTLER, STEIN und WIMBER (1960), die mit dem AR-10 Stripping-Film beim sog. "cell squash" von *Tradescantia palludosa* ein Verhältnis von 10,9 : 1 fanden. Bei Anwendung von NTB-Emulsin (KODAK) betrug dagegen das Verhältnis 19,3 : 1. Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die gefundenen Relationen. Dabei ist darauf hinzuweisen, daß die von CLEAVER und HOLFORD (1965) angegebenen Werte aus der Silberkornzahl über L-Zellen und der spezifischen Aktivität des ^3H -Thymidins errechnet wurden unter der angenommenen Voraussetzung, daß bei ^3H -Thymidin-Konzentrationen des Mediums über 10^{-6} M der Gesamtbedarf der Zelle an Thymidin für die DNS-Synthese ausschließlich aus der Kulturflüssigkeit gedeckt wird.

Infolge der Selbstabsorption im Gewebe gelangt nur ein Bruchteil der β -Teilchen bis in den Bereich des aufgelegten Filmes und erzeugt dort Silberkörner. Diesen die Silberkörner verursachenden Anteil der β -Zerfälle bezeichnet man als Selbstabsorptionskoeffizienten (siehe MAURER und PRIMBSCH, 1964).

Präparat Nr.	Zellen Deckglas ($\times 10^5$)	SkZ m K	^3H -Index	dpm ($\times 10^4$)	Zerfälle Silberkorn
1	3,03	43,5	45,9	2,16	10,3
2	3,58	42,5	48,7	2,53	9,86
3	2,21	45,1	46,0	1,47	9,23
4	2,10	43,7	44,8	1,45	10,2
5	3,02	43,2	47,4	2,06	9,62
Mittelwert: 9,83					
(S = $\pm$ 0,422)					

Tabelle 4

Verhältnis der Zahl der β -Zerfälle zur Zahl der erzeugten Silberkörner, ermittelt an Autoradiogrammen mit AR-10-"stripping-film".

Seine Größe hängt von den Massenverhältnissen der Zellstrukturen ab.

Tabelle 5

Untersucher	Material	Zerfälle pro Silberkorn
HUGHES (1958)	Bakterien	5
HUGHES (1958)	"Cell smear"	20
LAJTHA und OLIVER (1959)	20 μ Schnitt	20
WIMBER et al. (1960)	"Cell squash"	10,9
KISIELSKI et al. (1961)	3 μ Schnitt	ca. 200
MAURER und PRIEBSCH (1964)	3 μ Schnitt	16
CLEAVER und HOLFORD (1965)	L-Zellen	19

Es wurde versucht, aus dem Trockengewicht der Gesamtzellen und der Kerne (siehe VIII/2) annähernd das Verhältnis Masse/cm² unter den gegebenen Verhältnissen der Zellkultur zu ermitteln. Hierzu wurde die durchschnittliche Flächenausbreitung der Kerne und der Gesamtzellen in Anlehnung an die Methode von HAUG (1955) untersucht.

Die Auszählungen wurden an Autoradiogrammen der oben beschriebenen Versuche durchgeführt, in denen die Zellen noch keinen geschlossenen Zellrasen bildeten und ausgebreitet auf dem Deckglas lagen.

Es wurde das auch für Silberkornauszählungen verwendete, in einem Meßokular befindliche Planquadrat benutzt, das bei einer Unterteilung in 20 x 20 Felder 400 Schnittpunkte aufweist (Flächengröße bei Anwendung von Ölimmersion 100 μ x = 80 x 80 μ). Es wurde die Zahl der jeweils in einem Planquadrat befindlichen Kerne sowie die Zahl der auf Karyoplasma und Cytoplasma liegenden Schnittpunkte bestimmt. Insgesamt wurden 902 Quadrate mit insgesamt 10.103 Kernen ausgewertet.

Aus den ermittelten Verhältnissen (Kernzahl/Planquadrat und Schnittpunkte/Karyoplasma bzw. Cytoplasma) ergab sich eine durchschnittliche Kernflächengröße von 182 μ^2 und eine durchschnittliche Flächengröße der Gesamtzelle von 439 μ^2 .

Aus diesen Ergebnissen wurde die durchschnittliche Massenbelegung im Bereich des Kernes errechnet. Sie beträgt $0,12 \text{ mg/cm}^2$. Ihr liegt das Gewicht des Kernes und einer über diesem liegenden Cytoplasmaschicht zugrunde.

Der sich aus dem Verhältnis Zahl der β -Zerfälle pro Silberkorn von 9,83 ergebende Selbstabsorptionskoeffizient von 0,102 und die gefundene durchschnittliche Massenbelegung im Bereich des Kernes von $0,12 \text{ mg/cm}^2$ stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LAURER und PRIMBSCH (1964), die sich unabhängig von den Massenverhältnissen spezieller Zellstrukturen auf die Masse/ cm^2 und der hiervon abhängigen Selbstabsorption beziehen.

D. DISKUSSION

Zur Utilisation der Pyrimidin-Desoxyribonukleoside für die RNS

Das CdR wurde hinsichtlich seiner Utilisation für die DNS und RNS im Gegensatz zu dem TdR bisher nur in sehr geringem Umfang untersucht. Nachdem REICHARD und ESTBORN (1951) fanden, daß das CdR ohne einen vorherigen Abbau in die DNS eingebaut wird, gilt es als "spezifischer Vorläufer der DNS" (SCHNEIDER und ROTHERHAM, 1961). Die Bezeichnung "spezifischer Vorläufer der DNS" sollte aber nur dann als zutreffend gelten, wenn dieser Vorläufer ausschließlich für die DNS und nicht, oder zumindest nicht in störender Weise, auch als Vorläufer für die Synthese anderer Zellbausteine dient. Ohne Einschränkung kann als solcher das TdR gelten. Als radioaktiv markierter Vorläufer führt es ausschließlich zu einer Markierung der DNS. Durch eine DNase-Behandlung histologischer Schnitte von Mäusen nach ^3H -TdR-Markierung gelang AMANO, MESSIER und LEBLOND (1959) die vollständige Beseitigung der ^3H -Markierung in den Autoradiogrammen. Eigene entsprechende Untersuchungen an HeLa-Zellen (MÜLLER, 1966c) führten zu den gleichen Ergebnissen. Durch eine DNase-Behandlung konnten nach ^3H -TdR-Inkubation 98 % der ^3H -Aktivität aus dem Material entfernt werden. Auch biochemische Untersuchungen über den Abbau des Thymidins mit verschiedenen Zellarten (siehe IV, 1) sowie auch an HeLa-Zellen zeigten, daß keine Abbauprodukte entstehen, die wiederum als Vorläufer der RNS in Betracht kommen.

Über eine Utilisation des CdR für die RNS* geben eigene Untersuchungsergebnisse Aufschluß. Vergleichende Untersuchungen mit ^3H -TdR und ^3H -CdR an HeLa-Zellen zeigten, daß das CdR von diesen auch für die RNS genutzt wird.

Bei der Verwendung von ^3H -CdR-(5-T) in einer Konzentration von 0,091 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich nach einstündiger Inkubation nicht ausschließlich eine Markierung der in der DNS-Synthese-Phase befindlichen Kerne, deren Prozentsatz durch ^3H -TdR-Markierung im Parallelversuch bestimmt werden konnte. Vielmehr trat nach

längerer Expositionszeit der Autoradiogramme auch über den nicht in der "S-Phase" befindlichen Kernen eine - allerdings schwache - Markierung auf. Ebenso waren über dem Cytoplasma einzelne Silberkörner zu lokalisieren. Durch Silberkornzählungen über den Kernen wurde ermittelt, daß etwa 7,5 % der in die Kerne eingebauten ^3H -Aktivität auf die RNS entfallen.

Spätere vergleichende autoradiographische Untersuchungen ohne und nach RNase-Behandlung zeigten nach einstündiger Inkubation bei Konzentrationen von 0,046 $\mu\text{g/ml}$ bei ^3H -CdR(G)-Präparaten etwa 11 % Anteil der ^3H -Aktivität an der RNS-Synthese und bei ^3H -CdR-(5-T)-Präparaten ca. 15 %.

Ebenso war zwischen dem Ausmaß der Utilisation des CdR für die RNS und der Konzentration des Vorläufers im Medium eine Beziehung zu erkennen. Das ergaben vergleichende autoradiographische Untersuchungen unbehandelter Präparate und solcher nach RNase-Behandlung. Der Anteil der in die RNS eingebauten ^3H -Aktivität stieg bei einer Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ Medium auf 60 % an.

Diese autoradiographischen Untersuchungen beweisen, daß das CdR auch ein Vorläufer der RNS ist. Die Ergebnisse können jedoch nur annähernd Aufschluß über die prozentuale Beteiligung an der RNS-Synthese geben, da infolge der Fixierung und der Waschprozesse vor der Herstellung der Autoradiogramme mit einer teilweisen Herauslösung von RNS aus den Zellen gerechnet werden muß (SCHNEIDER und MAURER, 1963).

Bei den Untersuchungen wurden die über dem Cytoplasma liegenden Silberkörner nicht berücksichtigt. Es zeigte sich, daß bei den Versuchszeiten von einer Stunde die Zahl der über dem Cytoplasma liegenden Silberkörner sehr gering war im Vergleich zu der Silberkornzahl über den Kernen, deren Entstehung der ^3H -RNS-Aktivität zuzuschreiben war. Erst bei längeren Versuchszeiten änderte sich dieses Verhältnis. Die Erklärung hierfür ist, daß im Cytoplasma selbst keine nennenswerte RNS-Synthese stattfindet. Als primäre Orte der RNS-Synthese sind vielmehr der Kern und insbesondere der Nukleolus anzusehen. Die hier synthetisierte RNS gelangt erst mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung in das Cytoplasma (OEHLERT, 1961; STÖCKER, MAURER, ALTMANN, 1961; STÖCKER, 1962 a, b).

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann zusammenfassend gesagt werden, daß das CdR zwar zum größten Teil für die DNS-Synthese, zu einem geringeren, jedoch nicht unerheblichen Teil auch für die RNS-Synthese verwendet wird. Die Rate der Utilisation für die RNS ist abhängig von der Konzentration des Vorläufers im Medium; sie beträgt etwa 10 % der für die DNS utilisierbaren Menge und erhöht sich bei einer Konzentration von 0,46 $\mu\text{g/ml}$ an und kann bei einer Konzentration von 4,6 $\mu\text{g/ml}$ auf 60 % oder darüber ansteigen.

Der prozentuale Anteil der Pyrimidindesoxyribonukleoside Thymidin und Desoxycytidin an der DNS-Synthese

Bisher war nur wenig darüber bekannt, in welchem Ausmaß verabreichtes TdR oder CdR an der natürlichen DNS-Synthese teilnehmen können. Von LANG, PILGRIM und MAURER (1966) durchgeführte Untersuchungen über den prozentualen Anteil des ^3H - und ^{14}C -TdR an der DNS-Synthese verschiedener Zellarten der Maus zeigten eine von der Menge des verabreichten Vorläufers abhängige Utilisation. Bei einer Gabe von 0,36 μg TdR/Maus betrug der Anteil des verabreichten TdR an der neugebildeten DNS-TdR nur 0,1 %, bei Gaben von 3.600 μg /Maus wurde jedoch ein Anteil von 60 % erreicht (STEWART et al., 1965).

Entsprechende Untersuchungen von LANG, MÜLLER und MAURER (1967) an HeLa-Zellen zeigten auch hier eine von der Konzentration des Vorläufers im Medium abhängige Beteiligung an der neugebildeten DNS. Es wurde biochemisch die spezifische Aktivität der DNS und autoradiographisch der mittlere ^3H -Index gemessen. Hieraus und aus der Dauer der DNS-Synthese-Phase konnte der Anteil des verabreichten TdR an dem neugebildeten DNS-TdR ermittelt werden. Die Abbildung 20 gibt Aufschluß über die Ergebnisse der biochemischen sowie auch autoradiographischen Untersuchungen. Es ist die Silberkorndichte über den markierten (in der DNS-Synthese-Phase befindlichen) Kernen (SkZ/mK) bei steigender TdR-Konzentration des Mediums dargestellt. Die SkZ/mK wurde hier zu dem entsprechenden Anteil von ^3H -TdR in neugebildeter DNS-TdR in Beziehung gesetzt. (Die autoradiographischen Ergebnisse beziehen sich auf eine spezifische Aktivität von 6.700 mC/mMol und

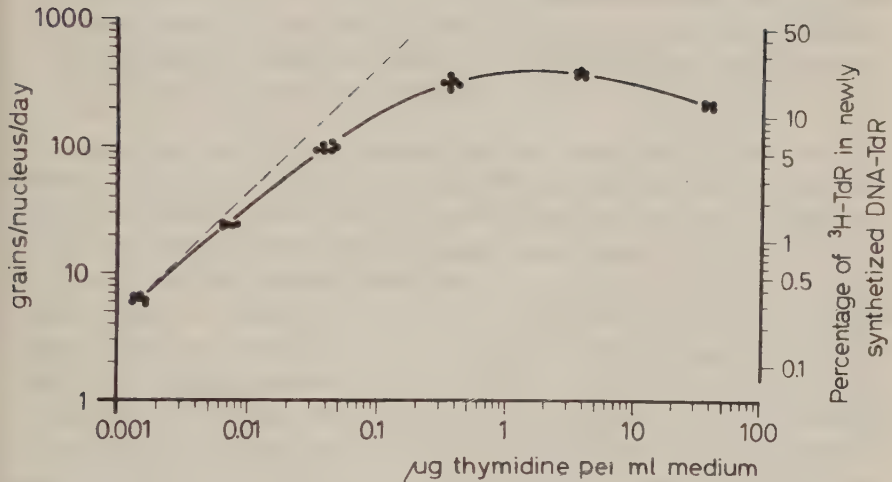


Abbildung 20

Aus: LANG, MÜLLER und MAURER (1967): "Percental participation of labeled thymidine in the synthesis of DNA-thymine in mouse tissues and HeLa-cell cultures". Exptl. Cell Research(im Druck).

Prozentuale Beteiligung des ^3H -TdR an neugebildeter DNA-TdR von HeLa-Zellen. (Ergebnisse autoradiographischer und biochemischer Untersuchungen) Abszisse: µg-TdR/ml Medium. Ordinate links: SkZ/mK (bezogen auf Untersuchungen mit einer spezif. Aktivität von 6.700 mC/mMol und einer Inkubationszeit von 40 Minuten.) Ordinate rechts: Prozentuale Beteiligung des ^3H -TdR an neugebildetem DNS-TdR.

eine Inkubationszeit von 40 Minuten.) Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß den HeLa-Zellen verabreichtes TdR nur zu maximal etwa 25 % an dem neugebildeten DNS-TdR beteiligt sein kann. Das gilt für eine Konzentration von etwa 2 $\mu\text{g/ml}$ Kulturmedium. Höhere TdR-Konzentrationen führen offenbar zu einer Hemmung der DNS-Synthese und somit zu einer Minderung des Einbaues von ^3H -TdR. (MATHIAS und FISCHER, 1962; PAINTER, DREW und RASMUSSEN, 1964; SCHACHTSCHABEL, LAZARUS, FARBER und FOLEY, 1966.)

Das CdR ist im Vergleich zum TdR prozentual in noch geringerem Maße an der Neubildung der DNS beteiligt. So ergaben vergleichende autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -TdR, ^3H -CdR-(G) und ^3H -CdR-(5-T) bei äquimolaren Konzentrationen (0,049 μg TdR/ml, 0,046 μg CdR/ml Medium) Inkorporationsverhältnisse von 1 : 0,115 : 0,058 (^3H -TdR : ^3H -CdR(G) : ^3H -CdR-5-T) (siehe II, 2c). Hierbei ist die gegenüber ^3H -CdR-(G) geringe Utilisation des ^3H -CdR-(5-T) nur eine scheinbare, da bei der Verwendung dieser Markierungsart nur die Desoxycytidylsäure der DNS, nicht jedoch die Thymidylsäure markiert ist. Wie die Untersuchungen der Inkorporationsverhältnisse als Funktion der Konzentration zeigten, nimmt der Anteil des in die DNS eingebauten CdR ebenfalls mit steigendem Angebot zu, und zwar etwas stärker als bei^{es}dem TdR der Fall ist.

Sämtliche Ergebnisse, die aus den Untersuchungen über die von der Konzentration der Vorläufer im Kulturmedium abhängige Utilisation des TdR und des CdR gewonnen wurden, sind in der Abbildung 21 zusammengefaßt: Der Abszissenmaßstab gibt die im Medium vorliegende Menge von TdR bzw. CdR/ml Medium an. Die linke Ordinate zeigt den Prozentsatz von ^3H -TdR oder ^3H -CdR in neugebildeter DNS-TdR. Die rechte Ordinate gibt den Prozentsatz von ^3H -CdR in neugebildeter DNS-TdR und DNS-CdR an. Die eingezeichneten Kurven A und C sind auf die linke, die Kurve B ist auf die rechte Ordinate zu beziehen.

Nach den autoradiographischen und biochemischen Untersuchungen wird das CdR zu etwa je 50 % für DNS-TdR und für DNS-CdR utillisiert. Eine ähnliche Ausnützung des Vorläufers fanden bereits REICHARD und ESTBORN (1951) nach der Verabreichung von ^{15}N -CdR bei den Geweben der Ratte. MALEY und MALEY (1963) dagegen fanden

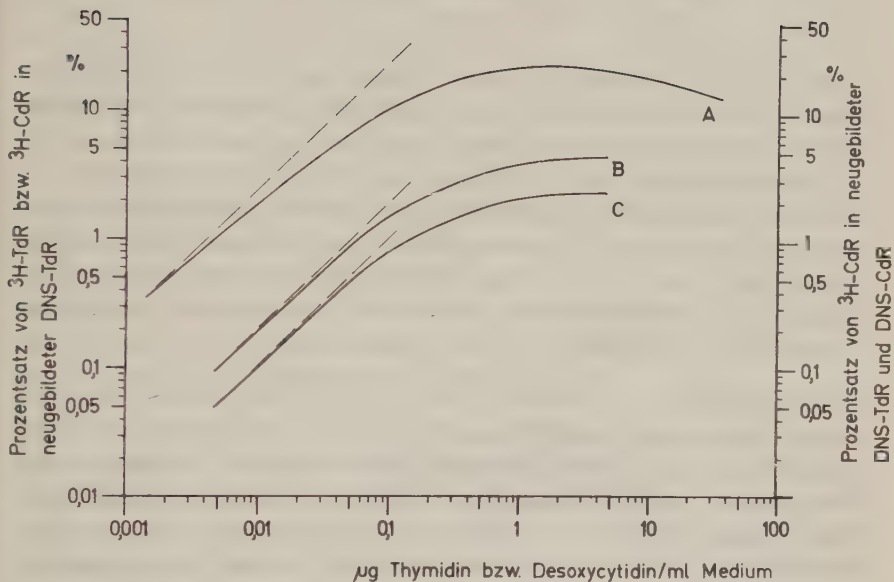


Abbildung 21

Prozentualer Anteil von ^3H -Thymidin bzw. ^3H -Desoxycytidin an der DNS-Synthese der HeLa-Zellen:

Abszisse: Konzentration des TdR bzw. des CdR im Kulturmedium.
 Ordinate: links: Prozentualer Anteil von ^3H -TdR oder ^3H -CdR an neugebildetem DNS-TdR, rechts: Anteil von ^3H -CdR an neugebildetem DNS-TdR und DNS-CdR. Kurve A (TdR) und Kurve C (CdR) sind zu beziehen auf die linke Ordinate, Kurve B (CdR) zu beziehen auf die rechte Ordinate.

bei der Verwendung von $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Desoxycytidin an Hühnerembryonal-Gewebe ein Utilisationsverhältnis von 2 : 1 für DNS-TdR : DNS-CdR. Die mit ^3H -CdR-(G) sowie ^3H -CdR-(5-T) gefundenen Ergebnisse lassen nicht erkennen, daß sich das Verhältnis der für DNS-TdR und DNS-CdR utilisierten Anteile bei steigendem Angebot ändert.

Die Kurve A in der Abbildung 21 (prozentualer Anteil des TdR an neugebildetem DNS-TdR) sowie die Kurve B (für neugebildetes DNS-TdR und DNS-CdR utilisiertes CdR) zeigen einen beinahe gleichartigen Verlauf. Offensichtlich scheint jedoch der Anstieg zwischen $0,005\text{ }\mu\text{g}$ und $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$ Medium geringfügig voneinander abzuweichen. (Die gestrichelten Linien (Winkel 90°) deuten eine lineare Beziehung zwischen Angebot und Inkorporation an.) In diesem Bereich ist die Utilisation bei steigender Konzentration offenbar bei dem CdR günstiger.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Utilisation der beiden Pyrimidindesoxyribonukleoside TdR und CdR für die DNS der HeLa-Zellen von der Konzentration des Vorläufers im Medium abhängig ist. Die Verwendung des TdR für neugebildetes DNS-TdR kann maximal etwa 25 % erreichen. Die Utilisation des CdR für neugebildete DNS ist wesentlich geringer als die des Thymidins. Bei den höchsten der verwendeten Konzentrationen beträgt die Beteiligung des CdR an neugebildetem DNS-TdR und -CdR ca. 4,5 %. CdR wird jedoch nicht ausschließlich als Desoxycytidylsäure, sondern ebenfalls als Thymidylsäure in die DNS eingebaut. Das Utilisationsverhältnis beträgt etwa 50 : 50 (Thymidylsäure : Desoxycytidylsäure).

Die Silberkornzahl als Maß für die Menge inkorporierter DNS-Vorläufer

Die Gesamtmenge eines verabreichten DNS-Vorläufers, die von einer Zelle während der Verdoppelung ihrer DNS-Menge inkorporiert wird, müßte aus der gemessenen Silberkornzahl über den markierten Kernen errechenbar sein, wenn weiterhin folgende Größen bekannt wären: 1. Die Zahl der β -Zerfälle des Tritiums, die notwendig sind, ein Silberkorn im Autoradiogramm hervorzurufen, 2. die spezifische Aktivität des verabreichten Vorläufers 3. die Dauer der DNS-Synthese-Phase. Die jeweils verwandte spe-

zifische Aktivität darf als bekannt vorausgesetzt werden.

Die Zahl der für die Entstehung eines Silberkorns notwendigen β -Zerfälle des Tritiums wurde bestimmt (siehe VIII). Das Ergebnis von 9,83 : 1 (β -Zerfälle/Silberkorn) ist gültig für die Verhältnisse einer am Glas fixierten HeLa-Zellkultur, für die angewandten Präparationsmethoden und die Verwendung von AR-10 "stripping-film" (KODAK, London). Es entspricht am ehesten dem Ergebnis von WIMBER, QUASTLER, STEIN und WIMBER (1960), die bei der Anwendung von AR-10 stripping film bei dem sogenannten "cell squash" von Tradescantia palludosa ein Verhältnis von 10,9 : 1 fanden. Der sich aus dem Verhältnis 9,83 : 1 ergebende Selbstabsorptionskoeffizient (der die Silberkörner verursachende Anteil der β -Zerfälle) beträgt 0,102. Das Verhältnis von 9,83 : 1 hat nur Gültigkeit für Silberkornzählungen im Bereich des Kernes, da im Bereich des Cytoplasmas bereits andere Selbstabsorptionsverhältnisse gegeben sind.

Die Dauer der DNS-Synthese-Phase wurde mit Hilfe zweier Methoden bestimmt, durch Anwendung der sogenannten "Prozent-markierter-Mitosen-Methode" sowie der "Doppelmarkierung". Danach betrug die Dauer der "S-Phase" 8,3 Stunden. Für die HeLa-Zellen wurden bisher folgende Zeiten ermittelt: HeLa-Zellen in Medium mit Pferdeserum: 8,5 h, mit Kälberserum 8 - 10 Stunden (PAINTER und DREW, 1959), HeLa-Zellen in Kälberserum 8 - 8,8 h (SEEMAYER, HAAS und MAASS, 1966).

Aus den gegebenen Größen (β -Zerfälle/Silberkorn und Dauer der S-Phase) kann die Menge eines verabreichten Vorläufers errechnet werden, die während der Dauer einer S-Phase inkorporiert wird.

Die Berechnung schließt die Ermittlung der Zahl der β -Zerfälle /Minute aus der SkZ/mK (mittlere Silberkornzahl pro markiertem Kern für eine Expositionszeit von 1 Tag) ein:

$$\text{dpm}^* = \frac{\text{SkZ/mK}}{\text{Selbstabsorptionskoeffizient} \times \text{Minuten/Tag}}$$

(Der Selbstabsorptionskoeffizient beträgt 0,102.)

* dpm = disintegrations per minute = radioaktive Zerfälle pro Minute.

Die während einer S-Phase inkorporierte Menge eines Vorläufers (V) ist nach folgender Gleichung zu berechnen:

$$\text{Spezifische Aktivität des Vorläufers} = \frac{{}^3\text{H-Aktivität}}{\text{mMol}} = \frac{\text{SkZ/mK} \times \text{Dauer der S-Phase}}{\text{Selbstabsorpt.-koeff.} \times 1400 \times V}$$

Das folgende Beispiel ist bezogen auf folgende Werte: Spezifische Aktivität 5.000 mC/mMol, SkZ/mK = 21 bei einer Konzentration von 0,0049 µg TdR/ml Medium und auf eine Inkubationszeit von 1 h. Die spezifische Aktivität wird hier vereinfacht angegeben mit dpm/g ($1,11 \times 10^{13}$ dpm/0,242 g TdR).

$$\frac{1,11 \times 10^{13}}{0,242} = \frac{21 \times 8,3}{0,102 \times 1440 \times V}$$

$$\text{Während der S-Phase inkorp. Menge des Vorläufers(V)} = \frac{21 \times 8,3 \times 0,242}{1,11 \times 10^{13} \times 0,102 \times 1440} = 2,59 \times 10^{-14} \text{ g TdR}$$

Bei diesem errechneten Wert von $2,59 \times 10^{-14}$ g handelt es sich demnach um die TdR-Menge, die während einer S-Phase für die Gesamtmenge neugebildeter DNS eines HeLa-Zellkernes bei einer Konzentration von 0,0049 µg/ml aus dem Medium utlilisiert wird. - Auf dieses Ergebnis soll weiter unten nochmals eingegangen werden.

Zum DNS-Gehalt der HeLa-Zellen

Zur Bestimmung des DNS-Gehaltes eines Zellsystems können entweder biochemische oder quantitativ-histochemische Methoden herangezogen werden. Durch die Anwendung histochemischer Methoden können Verteilungsmuster über den DNS-Gehalt/Kern innerhalb einer Gesamtpopulation aufgestellt werden (siehe SANDRITTER und KLEINHANS, 1964). Die dabei sichtbar werdenden Schwankungen des DNS-Gehaltes sind einmal auf unterschiedliche Ploidiegrade und zum anderen auf das unterschiedliche Alter der Zellen innerhalb des Generationszyklus zurückzuführen. Durch die Anwendung biochemischer Methoden dagegen wird der mittlere DNS-Gehalt der gesamten Zellpopulation bestimmt. Jedoch ist es möglich, aus dieser

Ergebnis bei Kenntnis der Dauer der Einzelphasen des Generationszyklus den DNS-Gehalt von Zellen verschiedenen Alters innerhalb des Generationszyklus, also auch den einfachen und doppelten DNS-Gehalt einer HeLa-Zelle, zu berechnen.

Im vorliegenden Falle wurde der mittlere DNS-Gehalt einer Zelle aus der Gesamtpopulation durch Anwendung biochemischer Methoden bestimmt, um ein einheitliches Bezugssystem für die inkorporierten Mengen der verabreichten Vorläufer zu erhalten. Die durch autoradiographische Untersuchungen ermittelten in die S-Phase-Kerne eingebauten Mengen eines Vorläufers wurden in Beziehung gesetzt zu dem einfachen DNS-Gehalt bzw. der gleichgroßen Menge "neugebildeter" DNS einer Zelle. Auf diese Weise konnte gleichfalls die prozentuale Beteiligung eines Vorläufers an der DNS-Synthese berechnet werden. Vergleiche mit der durch Anwendung biochemischer Methoden ermittelten prozentualen Beteiligung des Vorläufers an der Menge "neugebildeter" DNS (LANG, MÜLLER und MAURER, 1967) konnten dazu dienen, die Richtigkeit der Einzelergebnisse zu überprüfen.

(Unter dem "einfachen" DNS-Gehalt soll die DNS-Menge verstanden werden, die nach Beendigung der Mitose in einer Tochterzelle vorliegt, unter "neugebildeter" DNS dagegen die Menge, die während der DNS-Synthese-Phase zu der "einfachen" hinzukommt.)

Der mittlere DNS-Gehalt der HeLa-Zellen beträgt $1,47 \times 10^{-11}$ g. Der DNS-Gehalt dieses Tumorzellsystems ist erwartungsgemäß höher als der mittlere DNS-Gehalt menschlicher Somazellen, der mit 6,0 bzw. $6,8 \times 10^{-12}$ g angegeben wird (nach VENDRELY, 1955). Der gemessene Wert von $1,47 \times 10^{-11}$ g macht ca. 18 % des Trockengewichts des Zellkernes aus, für den ein mittleres Gewicht von $8,1 \times 10^{-11}$ g bestimmt wurde. Dieses Verhältnis stimmt mit entsprechenden Relationen überein, die nach Untersuchungen beim Kalb und Rind gefunden wurden (ALLFREY, DALY und MIRSKY, 1955; siehe auch bei GRUNDMANN, 1964).

Wie oben bereits angedeutet, kann bei Kenntnis der Dauer des Generationszyklus und seiner Teilphasen aus dem mittleren DNS-Gehalt einer Population (siehe VII, 1) auch der mittlere DNS-Gehalt der Zellen innerhalb der Teilphasen des Zyklus berechnet werden. Hierbei ist die unterschiedliche Häufigkeitsverteilung

der Zellen über den Einzelphasen bei dem vorliegenden exponentiellen Wachstum zu berücksichtigen (LENNARTZ und MAURER, 1964). Die Abbildung 22 (nicht schraffierte Flächen) veranschaulicht nochmals die Häufigkeitsverteilung der Zellen in einer "steady-state-Situation" (b) und bei "exponentiellem Wachstum" (a) (siehe auch Abbildung 16). Bei dem exponentiellen Wachstum nimmt die Zahl der Zellen vom Beginn der G_1 -Phase zum Ende der Mitose hin ab. Durch Integration kann der Prozentsatz der Zellen innerhalb der Einzelphasen des Generationszyklus ermittelt werden.

Ebenso ist es möglich, auf entsprechende Weise den mittleren DNS-Gehalt der HeLa-Zellen innerhalb der Einzelphasen des Zellzyklus zu berechnen und weiterhin das Verhältnis der "einfachen" zur "neugebildeten" DNS-Menge in einer Gesamtpopulation zu bestimmen. Die Abbildung 22a veranschaulicht gleichfalls diese Verhältnisse. Hierbei stellen die nicht schraffierten Flächen den Anteil "einfacher" DNS, die schraffierten Flächen den Anteil "neugebildeter" DNS in der Gesamtzahl der Zellen einer jeden Teilphase dar. Hieraus wird zugleich deutlich, daß der überwiegende Teil der DNS einer Population aus der nach der Mitose verbliebenen "einfachen" DNS-Menge besteht.

In der G_1 -Phase befindliche Zellen weisen einen "einfachen" DNS-Gehalt auf. Innerhalb der S-Phase findet sodann die Verdoppelung der DNS-Menge statt. Der "Zuwachs" der DNS-Menge ist ebenfalls durch Integration zu ermitteln. Die Zellen der G_2 -Phase und der Mitose haben gegenüber der G_1 -Phase den doppelten DNS-Gehalt.

Legt man derartigen Berechnungen eine Generationszeit von 18,5 Stunden und die für die Teilphasen ermittelten Zeiten ($S = 8,3$ h, $G_2 = 3,1$ h, $M = 0,8$ h) zugrunde, so ergibt sich ein Verhältnis von $1 : 0,364$ von einfacher zu neugebildeter DNS-Menge in der Gesamtpopulation.

Die mittlere DNS-Menge einer HeLa-Zelle betrug unter den gleichen Voraussetzungen $1,47 \times 10^{-11}$ g. Aus dem Verhältnis $1 : 0,364$ ("einfacher" : neugebildeter DNS-Menge in der Gesamtpopulation) ist der "einfache" DNS-Gehalt einer HeLa-Zelle zu berechnen, der während der gesamten G_1 -Phase in den Zellen vorliegt:

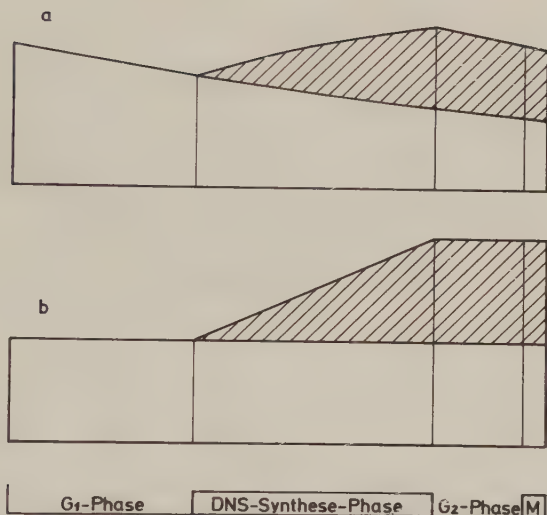


Abbildung 22

Mengenverhältnis zwischen "einfacher" und "neugebildeter" DNS in einer Gesamtpopulation:

a) "exponentielles" Wachstum, b) "steady state". Die nicht schraffierten Flächen repräsentieren erstens die Häufigkeitsverteilung der Zellen über den Teilphasen des Generationszyklus; zweitens stellen sie die Gesamtmenge der "einfachen" DNS aller Zellen innerhalb der einzelnen Teilphasen dar. Die schraffierten Flächen bedeuten die während der DNS-Synthese-Phase "neugebildete" DNS-Menge. (Die schematische Darstellung a) ist bezogen auf die Dauer der Teilphasen von HeLa-Zellen mit einer Generationszeit von 18,5 Stunden. Das Verhältnis von "einfacher" zu "neugebildeter" DNS-Menge beträgt $1 : 0,36_4$.)

$\frac{1,47 \times 10^{-11} \text{ g} \times 1}{1,36} = 1,08 \times 10^{-11} \text{ g}$. Den doppelten DNS-Gehalt weisen die Zellen nach der Beendigung der S-Phase, also während der gesamten G₂- und Mitose-Phase auf. Zwischen diesen Werten liegt der DNS-Gehalt der HeLa-Zellen im Verlauf der S-Phase.

Oben wurde dargelegt, daß eine HeLa-Zelle während ihrer S-Phase bei einer Konzentration von 0,0049 µg TdR/ml Medium $2,59 \times 10^{-14} \text{ g } ^3\text{H-TdR}$ in die DNS einbaut. Nach dem von CHARGAFF und LIPSHITZ (1953) an der menschlichen Milz ermittelten Basenverhältnis ist die dem inkorporierten TdR entsprechende DNS-Menge zu berechnen (Faktor 4,35). $2,59 \times 10^{-14} \text{ g} \times 4,35 = 1,13 \times 10^{-13} \text{ g}$. Diese DNS-Menge macht 1,05 % der oben errechneten "einfachen" DNS-Menge einer HeLa-Zelle aus, die zugleich der während einer DNS-Synthese-Phase "neugebildeten" DNS-Menge entspricht.

Nach den Ergebnissen der biochemischen und autoradiographischen Untersuchungen (LANG, MÜLLER und MAURER, 1967) betrug der Anteil des $^3\text{H-TdR}$ an neugebildetem DNS-TdR bei der gleichen Konzentration im Medium ebenfalls ca. 1 %. Hier ist also eine gute Übereinstimmung von Ergebnissen zu finden, die auf verschiedene Weise ermittelt wurden.

Der Abbau des Desoxycytidins

Nach den in Abschnitt IV, 2 dargelegten Ergebnissen wird das CdR in sehr rascher Weise abgebaut. Die dabei entstehenden Hauptabbauprodukte sind UdR und Uracil sowie in geringem Maße Cytosin. Offensichtlich wird dabei das zunächst entstehende UdR weiterhin zu Uracil abgebaut. Thymin war an der Gesamtmenge der Abbauprodukte nur mit ca. 4 % beteiligt.

SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) studierten den CdR-Abbau mit $2\text{-}^{14}\text{C-CdR}$ an Hepatoma-Zellen. Die von ihnen gewählten Untersuchungszeiträume waren 15', 30' und 60'. Als Hauptabbauprodukt wurden UdR und in geringerem Maße Uracil gefunden. TdR und Thymin wurden nur in geringer Menge nachgewiesen. Da keine Angaben über die verwendeten Zellmengen vorliegen, ist ein Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nur bedingt möglich. Das von SCHNEIDER und ROTHERHAM (1961) während des gewählten Versuchszeitraums von 60' gefundene Verhältnis UdR : U = ca. 10 : 1 gestattet

keine Schlußfolgerungen über einen möglichen weiteren Abbau des Udr. Es kann angenommen werden, daß auch Hepatoma-Zellen das Udr ebenso wie HeLa-Zellen weiter zu Uracil abbauen.

Die Untersuchungen von MALEY und MALEY (1963) mit 2-¹⁴C-Desoxycytidin an Hühnerembryonalgewebe hatten im wesentlichen zum Ziel, festzustellen, in welchem Ausmaß Cdr für die Thymidylsäure und die Desoxycytidylsäure verwertet wird. Sie ermittelten ein Utilisationsverhältnis von 2 : 1 von DNS-TdR : DNS-Cdr. Aufgrund ihrer Untersuchungen zeigten sie die alternativen Wege der Cdr-Utilisation für die Thymidylsäure der DNS auf (siehe die vereinfachte Darstellung nach COOPER und MILTON, 1964, Abbildung 23), die einleitend besprochen wurden.

HeLa-Zellen utilisieren Cdr zu ca. 50 % für Thymidylsäure. Das Auftreten großer Mengen von Udr spricht dafür, daß hierbei die direkte Desaminierung des Cdr im Vordergrund steht, wie sie von MALEY und MALEY (1961) als bevorzugt für Neoplasmen beschrieben wurde. Es ist also anzunehmen, daß die Bildung des TMP vorwiegend auf dem Weg Cdr → Udr → dUMP → TMP erfolgt.

Vergleicht man die Ergebnisse, die bei den Abbauversuchen mit ³H-TdR (LANG, MÜLLER und MAURER, 1966) (siehe auch IV, 1) und mit ³H-Cdr (siehe IV, 2) gewonnen wurden, so ist erkennbar, daß sich der Abbau des Cdr wesentlich rascher vollzieht als derjenige des TdR. Die Untersuchungen über den Abbau des ³H-TdR durch die HeLa-Zellen wurden unter annähernd gleichen Bedingungen vorgenommen. Es lag dabei zu Versuchsbeginn eine TdR-Konzentration von 0,5 µg TdR/ml Medium vor. Sechs Stunden nach Versuchsbeginn waren ca. 50 % des verabreichten Vorläufers abgebaut. Die Hauptabbauprodukte waren Thymin und β-Ureido-iso-buttersäure. Der Abbau des Cdr dagegen vollzog sich wesentlich rascher. Bei Verwendung einer Konzentration von 0,78 µg/ml waren 50 % der verabreichten Menge in etwa 1/20 des gleichen Zeitraumes abgebaut.

Autoradiographische Untersuchungen über den Einbau des ³H-Cdr als Funktion der Zeit hatten gezeigt, daß ³H-Cdr nicht über einen längeren Zeitraum als 1 Stunde hinweg kontinuierlich inkorporiert wurde. Bereits durch eine veränderte Versuchsanordnung konnte sichergestellt werden, daß die Verminderung der

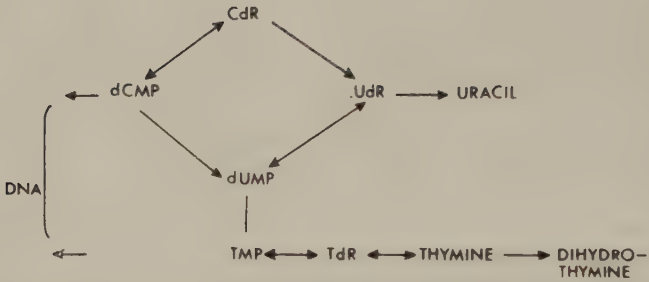


FIG. 7. -Metabolic inter-relations of pyrimidine DNA precursors. After Maley and Maley (1963).

Abbildung 23: aus COOPER und MILTON (1964)

Inkorporation des CdR in die DNS nicht auf eine "Hemmung" der DNS-Synthese zurückgeführt werden kann, sondern daß sehr wahrscheinlich ein rascher Abbau des Vorläufers hierzu führt. Durch die biochemischen Untersuchungen über den Abbau des CdR kann als bewiesen gelten, daß die Minderung der Inkorporation bei Versuchen über eine längere Zeit die Folge des raschen Abbaus des Vorläufers ist.

Andererseits konnte durch autoradiographische Untersuchungen gezeigt werden, daß zwischen dem TdR und CdR hinsichtlich ihrer Utilisation für die DNS ein Verhältnis von etwa 10 : 1 besteht. Das CdR wird also einerseits wesentlich rascher abgebaut als das TdR, andererseits in bedeutend geringerer Menge für die DNS utlilisiert. Es erschien daher von Interesse, festzustellen, in welchem Verhältnis die Mengen für die DNS utlilisierten und abgebauten CdRs zueinander stehen. Die gewählte Anordnung des biochemischen Versuches zum Studium des CdR-Abbaues gestattete, diese Beziehungen annähernd zu berechnen:

Aus der prozentualen Abnahme des CdR am Ende der Inkubationszeiten 20', 40' und 80' Minuten wurde errechnet, in welchem Zeitraum die Hälfte der verabreichten CdR-Menge abgebaut wurde. Diese Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$T_t = \frac{\ln 2 \times t}{\ln \frac{N_o}{N_t}}$$

Danach ergab sich eine Zeit von 16,2 Minuten.

Zu Versuchsbeginn betrug die Zellzahl/Roux-Flasche = $3,19 \times 10^7$. Die Abbauvorgänge über den weiteren Versuchszeitraum wurden auf eine "steady-state"-Situation der Zellkultur, also auf eine gleichbleibende Zellzahl bezogen. Es wurde angenommen, daß lediglich die in der S-Phase befindlichen HeLa-Zellen an dem CdR-Abbau beteiligt sind. Entsprechend den ^3H -Indices von 45,0 und 45,5 %, die nach 1-stündiger ^3H -TdR-Inkubation im Parallelversuch ermittelt wurden, betrug der jeweilige Anteil der S-Phasen-Kerne ca. 40,5 %. Vereinfachend wird vorausgesetzt, daß ein kontinuierlicher Abbau der gleichen CdR-Menge/Zeiteinheit erfolgt, wie er sich aus der Halbwertszeit-Berechnung ergab. Die Utilisa-

tion des CdR für die RNS soll hier unberücksichtigt bleiben.

Die während der Dauer einer S-Phase (8,3 h) von einer Zelle abgebaute CdR-Menge ist demnach =

$$\frac{\text{CdR-Menge/Roux-Flasche} \times \text{Dauer der S-Phase in Minuten} \times 100}{2 \times \text{Zellzahl/Roux-Fl.} \times \text{Halbwertszeit in Min.} \times \% \text{S-Phasen-Kerne}}$$

$$= \frac{6,25 \times 10^{-5} \text{ g} \times 8,3 \times 60 \times 100}{2 \times 3,19 \times 10^7 \times 16,2 \times 40,5} = 7 \times 10^{-11} \text{ g}$$

Bei einer Konzentration von 0,78 µg/ml Medium ist das CdR mit etwa 4 % an neugebildetem DNS-CdR und -TdR beteiligt. Die während der Dauer einer S-Phase in die DNS eingebaute CdR-Menge beträgt demnach etwa $9,5 \times 10^{-14}$ g. Es ergibt sich daraus etwa ein Verhältnis von 1 : 740 der für die DNS utilisierten CdR-Menge zu der abgebauten CdR-Menge.

Während verabreichtes TdR von HeLa-Zellen wie auch von anderen Zellarten in einem Phosphat-Pool für die DNS-Synthese gespeichert wird (PAINTER und DREW, 1959; GALL und JOHNSON, 1960; MÜLLER, 1966), konnte eine entsprechende Pool-Bildung von Derivaten des CdR nicht gefunden werden. Für diesen negativen Befund ergibt sich eine Erklärung aus dem Verhältnis der Mengen abgebauten und für die DNS utilisierten CdR.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Anwendung der autoradiographischen Technik nach ^3H -CdR-Markierung konnte bei vergleichenden Untersuchungen von Präparaten ohne und nach RNase- bzw. DNase-Behandlung festgestellt werden, daß das CdR von den HeLa-Zellen nicht ausschließlich für die DNS-, sondern auch für die RNS-Synthese verwendet wird. Der Prozentsatz des für die RNS utilisierten CdR ist abhängig von der Konzentration des Vorläufers im Medium. Bis zu Konzentrationen von etwa $0,46 \mu\text{g CdR/ml}$ beträgt bei einstündiger Inkubation der in die RNS des Zellkerns eingebaute Anteil der ^3H -Aktivität - gemessen an der für die DNS verwerteten Menge - ca. 10 %. Bei steigenden Konzentrationen erhöht sich dieser Anteil; er beträgt bei $4,6 \mu\text{g/ml}$ ca. 60 %.

CdR wird von HeLa-Zellen sowohl für neugebildetes DNS-TdR als auch DNS-CdR verwendet. Nach Ergebnissen biochemischer sowie autoradiographischer Untersuchungen mit ^3H -CdR verschiedener Markierungsformen beträgt der Anteil von ^3H -CdR an neugebildetem DNS-CdR und an neugebildetem DNS-TdR jeweils ca. 50 %.

Die Utilisation des CdR für die neugebildete DNS ist - ebenso wie die des TdR - abhängig von der Konzentration des Vorläufers im Medium. Es besteht jedoch keine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Vorläufers im Medium und seiner Utilisation für die DNS-Synthese.

Durch kombinierte autoradiographische und biochemische Untersuchungen mit ^3H -TdR und ^3H -CdR wurde die prozentuale Beteiligung der Vorläufer an neugebildetem DNS-TdR bzw. DNS-CdR und DNS-TdR ermittelt. Es zeigte sich, daß das CdR in geringerem Maße für die DNS utilisiert wird als das TdR. Bei den äquimolaren Konzentrationen von $0,049 \mu\text{g TdR}$ bzw. $0,046 \mu\text{g CdR/ml}$ Medium ergab sich hinsichtlich der Utilisation der beiden Vorläufer für die DNS ein Verhältnis von 1 : $0,11_5$ (TdR : CdR). Bei höheren Konzentrationen verändert sich dieses Verhältnis zugunsten des CdR. So beträgt bei den Konzentrationen von ca. $0,005 \mu\text{g/ml}$ der Anteil von ^3H -TdR an neugebildetem DNS-TdR ca. 1 %, der Anteil von ^3H -CdR an neugebildetem DNS-CdR und -TdR

etwa 0,1 %. Dagegen ist ^3H -CdR bei der höchsten der untersuchten Konzentrationen von $4,6 \mu\text{g/ml}$ mit etwa 4,5 % in entsprechender Weise beteiligt. Der größte Anteil des ^3H -TdR an neugebildetem DNS-TdR wird dagegen bei einer Konzentration von etwa $2 \mu\text{g/ml}$ mit 25 % erreicht.

Mit Hilfe von zwei verschiedenen autoradiographischen Methoden wurde die Dauer der Teilphasen des Generationszyklus von HeLa-Zellen bestimmt. Für die einzelnen Teilphasen wurden folgende Werte ermittelt: S-Phase = 8,3, G_2 -Phase = 3,1 und Mitose-Phase = 0,8 Stunden.

Biochemische Untersuchungen ergaben einen mittleren DNS-Gehalt der HeLa-Zellen in der Gesamtpopulation von $1,47 \times 10^{-11}$ g. Bei Kenntnis der Dauer der Teilphasen des Generationszyklus konnte das Verhältnis der Menge "einfacher", nach der Beendigung der Mitose in den Zellen vorhandener DNS zu der Menge "neugebildeter" DNS in der Gesamtpopulation ermittelt werden. Die Mengen "einfacher" zu "neugebildeter" DNS in der Gesamtpopulation verhalten sich bei einer Generationszeit von 18,5 Stunden wie 1 : 0,364. Danach beträgt der einfache DNS-Gehalt einer HeLa-Zelle im Mittel $1,08 \times 10^{-11}$ g.

Es wurde das Verhältnis der für die Entstehung eines Silberkorns erforderlichen β -Zerfälle des Tritiums ermittelt. Es beträgt für HeLa-Zellkerne, die am Glas fixiert wurden, bei der Anwendung von AR 10 "stripping-film" 9,83 : 1. Diesem Verhältnis entspricht ein Selbstabsorptionskoeffizient von 0,102. Nach Untersuchungen des Trockengewichtes der Gesamtzellen und der isolierten Kerne sowie nach Bestimmung der Flächengrößen der Zellen und Kerne in Autoradiogrammen wurde eine durchschnittliche Massenbelegung von $0,12 \text{ mg/cm}^2$ im Bereich der HeLa-Zellkerne errechnet. Dieses Ergebnis steht nach der Literatur in guter Übereinstimmung mit dem Selbstabsorptionskoeffizienten von 0,102.

Aus den Ergebnissen der Silberkornauszählungen konnte unter Zugrundelegung des Verhältnisses β -Zerfälle/Silberkorn die während der Dauer einer DNS-Synthese-Phase für die "neugebildete" DNS utilisierte Menge des ^3H -markierten Vorläufers berechnet werden. Diese wurde in Beziehung gesetzt zu der von der Zelle während einer DNS-Synthese-Phase neugebildeten Menge, die aus dem ein-

fachen DNS-Gehalt einer HeLa-Zelle berechnet werden konnte. Auf diese Weise konnte ebenfalls die prozentuale Beteiligung des Vorläufers an neugebildetem DNS-TdR bzw. DNS-CdR bestimmt werden. Die Ergebnisse standen in guter Übereinstimmung mit den oben genannten Werten.

Ferner wurde biochemisch der Abbau des CdR untersucht. HeLa-Zellen bauen CdR rasch zu Uridindesoxyribose und weiter zu Uracil ab. Cytosin konnte nur in geringer Menge nachgewiesen werden.

Nach den Ergebnissen der biochemischen Untersuchungen kann eine in der S-Phase befindliche HeLa-Zelle bei einer CdR-Konzentration von $0,78 \mu\text{g CdR/ml}$ während der Dauer einer S-Phase (8,3 h) insgesamt ca. $7 \times 10^{-11} \text{ g CdR}$ abbauen. Im gleichen Zeitraum unter gleichen Bedingungen vermag sie $9,5 \times 10^{-13} \text{ g CdR}$ für ihr neugebildetes DNS-TdR und -CdR zu utilisieren. Zwischen utilisierter und abgebauter CdR-Menge besteht demnach etwa das Verhältnis von 1 : 740.

HeLa-Zellen vermögen im Medium verabreichtes TdR in einem Pool zu speichern. Für CdR konnte eine derartige Pool-Bildung nicht nachgewiesen werden.

F. L I T E R A T U R

=====

- ALLFREY, V.G., M.M. DALY, and A.E. MIRSKY: Some observations on protein metabolism in chromosomes of non-dividing cells.
J.Gen.Physiol. 38, 415 (1955)
- ALTMANN, H.-W.: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen.
Verh.d.Dtsch.Ges.für Path. 50.Tag., Heidelberg 1966, Stuttgart 1966, S. 15.
- AMANO, M., B. MESSIER, and C.P. LEBLOND: Specificity of labelled thymidine as a deoxyribonucleic acid precursor in radioautography.
J.Histochem.Cytochem. 7, 153 (1959)
- BASERGA, R.: A study of nucleic acid synthesis in ascites tumor cells by two-emulsion autoradiography.
J.Cell Biol. 12, 633 (1962)
- BENDICH, A., H. GETLER, and G.B. BROWN: A synthesis of isotopic cytosine and a study of its metabolism in the rat.
J.biol.Chem. 177, 565 (1949)
- BIANCHI, P.A., A.R. CRATHORN, and K.V. SHOOTER: "The use of tritium-labelled thymidine in studies on the synthesis of deoxyribonucleic acids", in: Tritium in physical and biol. Sc., II. Int. At. En. Agency, Vienna, S. 269 (1962)
- BOLLUM, F.J., and V.R. POTTER: Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. VI. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA.
Cancer Res. 19, 561 (1959)
- CHARGAFF, E., and R. LIPSHITZ: J.Am.Chem.Soc. 75, 3658 (1953), zit.nach CHARGAFF, E.: Isolation and composition of the deoxypentose nucleic acids and of the corresponding nucleoproteins. In: The nucleic acids, I, S. 352, Hsg. E. CHARGAFF, and J.N. DAVIDSON: Academic Press Inc., New York, 1955.
- CAIRNIE, A.B., L.F. LAMERTON, and G.G. STEEL: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. I. Determination of the kinetic parameters.
Exptl. Cell Research 39, 528 (1965, a)
- CAIRNIE, A.B., L.F. LAMERTON, and G.G. STEEL: Cell Proliferation studies in the Intestinal Epithelium of the rat. II. Theoretical Aspects.
Exptl. Cell Research 39, 539 (1965, b)

- CANELLAKIS, E.S.: Some aspects of the metabolism in vitro of 2-C¹⁴ labeled orotic acid, uracil, uridine and uridylic acid.
Fed.Proc. 14, 324 (1955)
- CANELLAKIS, E.S.: Pyrimidine metabolism. I. Enzymatic pathways of uracil and thymine degradation.
J.Biol.Chem. 221, 315 (1956)
- CANELLAKIS, E.S.: Pyrimidine metabolism. III. The interaction of the catabolic and anabolic pathways of uracil metabolism.
J.Biol.Chem. 227, 701 (1957)
- CARO, L.G.: "High-resolution autoradiography". In: PRESCOTT, D.M., "Methods in cell physiology", Vol. I, Ac.Press N.Y. and London, 1964, Chapter 16, p.327.
- CATTANEO, S.M., H. QUASTLER, and F.G. SHERMAN: Proliferative cycle in the growing hair follicle of the mouse.
Nature 190, 923 (1961)
- CLEAVER, J.E., and R.M. HOLFORD: Investigations into the incorporation of 3-H-Thymidine into DNA in L-strain cells and the formation of a pool of phosphorylated derivatives during pulse labelling.
Biochim.Biophys.Acta 103, 654 (1965)
- COHN, W.E.: "Methods of isolation and chracterization of mono- and polynucleotides by ion-exchange chromatography". In: COLOWICK, S.P. and N.O. KAPLAN: "Methods in enzymology", Bd. III, S. 724, Ac.Press, New York, 1957.
- COMINGS, D.E.: Uridine-5-H-3 radioautography of the human sex chromatin body.
J.Cell Biol. 28, 437 (1966, a)
- COMINGS, D.E.: Incorporation of tritium of ³H-5-Uridine into DNA.
Exptl.Cell Research 41, 677 (1966, b)
- COOPER, E.H., and J.D. MILTON: The incorporation and degradation of pyrimidine DNA precursors by human leucocytes.
Brit.J.Cancer 18, 701 (1964)
- CRATHORN, A.R., and K.V. SHOOTER: Uptake of thymidine and synthesis of deoxyribonucleic acid in mouse ascites cells.
Nature 187, 614 (1960)
- DAVIDSON, J.N.: "The biochemistry of the nucleic acids", London 1953.
- DEFENDI, V., and L.A. MANSON: Analysis of the life-cycle in mammalian cells.
Nature 198, 359 (1963)

- DISCHE, Z.: Über eine neue charakteristische Farbreaktion der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktion. Mikrochemie 8, 4 (1930)
- DOMAGK, G.F.: In: E. HARBERS: "Die Nucleinsäuren", Stuttgart, 1964.
- DOUNCE, A.L.: "The isolation and composition of cell nuclei and nucleoli. In: "The nucleic acids" II, p.93. Hsg. E. CHARGAFF and J.N. DAVIDSON, Ac.Press Inc. New York, 1955.
- FEINENDEGEN, L.E., and V.P. BOND: Differential uptake of ^3H -thymidine into the soluble fraction of single bone marrow cells, determined by autoradiography. Exptl. Cell Research 27, 474 (1962)
- GALL, J.G., and W.W. JOHNSON: Is there "metabolic" DNA in the mouse seminal vesicle? J.Biophysic. and Biochem.Cytol. 7, 657 (1960)
- GRUNDMANN, E.: "Allgemeine Cytologie" (Eine Einführung in die funktionelle Morphologie der Zelle), Stuttgart 1964.
- HAMMARSTEN, E., P. REICHARD, and E. SALUSTE: Pyrimidine nucleosides as precursors of ribonucleic acid pyrimidines. Acta chem.scand. 3 (1949), 432.
- HAMMARSTEN, E., P. REICHARD, and E. SALUSTE: Pyrimidine nucleosides as precursors of pyrimidines in polynucleotides. J.Biol.Chem. 183, 105 (1950)
- HAUG, H.: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. Zschr.Anat.Entw.gesch. 118, 302 (1955)
- HEIDELBERGER, Ch., E. HARBERS, K.C. LEIBMAN, Y. TAKAGI, and V.R. POTTER: Specific incorporation of adenosine-5'-phosphate- ^{32}P into ribonucleic acid in rat liver homogenates. Biochim.Biophys.Acta 20, 445 (1956)
- HEIDELBERGER, Ch., K.C. LEIBMAN, E. HARBERS, and P.M. BHARGAVA: The comparative utilization of uracil- ^{14}C by liver, intestinal mucosa, and Flexner-Jobling carcinoma in the rat. Cancer Res. 17, 399 (1957)
- HEMPEL, K.: Über die gleichzeitige Messung von Tritium und ^{14}C in biologischem Material mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler. Atompraxis 10, 1 (1964)

- HILSCHER, W. und W. MAURER: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit C-14- und H-3-Thymidin. Naturwissenschaften 49, 352 (1962)
- HOTTA, Y., and H. STERN: Molecular facets of mitotic regulation, I. Synthesis of thymidine kinase. Proc.N.A.S. 49, 648 (1963)
- HUGHES, W.L., V.P. BOND, G. BRECHER, E.P. CRONKITE, R.B. PAIN-TER, H. QUASTLER und F.G. SHERMAN: Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. Proc.N.A.S. 44, 476 (1958)
- HURST, R.O., and G.C. BUTLER: The chromatographic separation of phosphatases in snake venoms. J.Biol.Chem. 193, 91 (1951)
- JACQUEZ, J.A.: Transport and enzymic splitting of pyrimidine nucleosides in Ehrlich cells. Biochim.Biophys.Acta 61, 265 (1962)
- KISIELSKI, W.E., R. BASERGA, and J. VAUPOTIC: The correlation of autoradiographic grain counts and tritium concentration in tissue sections containing tritiated thymidine. Radiat.Res. 15, 341 (1961)
- KOBURG, E. und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung mit 3-H-Thymidin über die Dauer der Desoxyribonukleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus. Biochim.Biophys.Acta 61, 229 (1962)
- LAJTHA, L.G., and R. OLIVER: The application of autoradiography in the study of nucleic metabolism. Lab.Invest. 8, 214 (1959)
- LANG, W., D. MÜLLER, and W. MAURER: Determination of thymidine metabolism in HeLa cell cultures by a combined electrophoretic and paper chromatographic method. Exptl.Cell Research 44, 645 (1966)
- LANG, W., D. MÜLLER, and W. MAURER: Percental participation of labeled thymidine in the synthesis of DNS-thymine in mouse tissues and HeLa-cells. Exptl.Cell Research (im Druck).
- LANG, W., Ch. PILGRIM und W. MAURER: Prozentualer Anteil von 3-H- oder 14-C-Thymidin an der DNS-Synthese von Zellarten der Maus. Naturwissenschaften 53, 210 (1966)

- LARK, K.G.: "Cellular control of DNA biosynthesis".
in: J.H. TAYLOR: Molecular Genetics,
New York and London 1963.
- LEIBMAN, K.C., and C. HEIDELBERGER: Incorporation of uracil-2-
C-14 into some normal resting normal growing and
neoplastic tissues in the rat.
Fed.Proc. 14, 243 (1955)
- LENNARTZ, K.J. und W. MAURER: Autoradiographische Bestimmung
der Dauer der DNS-Verdopplung und der Genera-
tionszeit beim Ehrlich-Ascitestumor der Mäus
durch Doppelmarkierung mit 14-C- und 3-H-Thy-
midin.
Z.Zellforsch. 63, 478 (1964)
- LORING, H.S., and J.G. PIERCE: Pyrimidine nucleosides and nucleo-
tides as growth factors for mutant strains of Neu-
rospora.
J.Biol.Chem. 153, 61 (1944)
- LUZZATI, V., and A. NICOLAIEFF: The structure of nucleohistones
and Nucleoprotamines.
J.Mol.Biol. 7, 142 (1963)
- MALEY, F., and G.F. MALEY: Nucleotide interconversions.
IV. Activities of deoxycytidylate deaminase and
thymidylate synthetase in normal rat liver and
hepatomas.
Cancer Res. 21, 1421 (1961)
- MALEY, G.F., and F. MALEY: Nucleotide interconversions.
VIII. Thymidine-sparing effect on the utiliza-
tion of de-cytidine by chick-embryo mince.
Biochim.Biophys.Acta 68, 293 (1963)
- MARCUS, Ph.I., J.M. SALB, and V.G. SCHWARTZ: Nuclear surface
N-acetyl neuraminic acid terminating receptors
for myxovirus attachment.
Nature 208, 1122 (1965)
- MARSH, J.C., and S. PERRY: Thymidine catabolism by normal and
leukemic human leukocytes.
J.Clin.Invest. 43, 267 (1964, a)
- MARSH, J.C., and S. PERRY: The reduction of thymine by human
leukocytes.
Archives of Biochem. and Bioph. 104, 146 (1964,b)
- MATHIAS, A.P., and G.A. FISCHER: The metabolism of thymidine by
murine leukemic lymphoblasts (L 5178 Y).
Biochem. Pharmacol. 11, 57 (1962)
- MAURER, W. und E. PRIMBSCH: Größe der B-Selbstabsorption bei der
3-H-Autoradiographie.
Exptl. Cell Research 33, 8 (1964)

- MÜLLER, D.: Über den Einfluß von Desoxycytidin auf die Thymidininkorporation von HeLa-Zellen (Autoradiographische Untersuchungen mit 3-H-Thymidin). Naturwissenschaften 53, 22 (1966, a)
- MÜLLER, D.: Autoradiographische Untersuchungen zur Bildung eines Pools von 3-H-Thymidin-Derivaten bei HeLa-Zellen. Naturwissenschaften 53, 503 (1966, b)
- MÜLLER, D.: Autoradiographische Untersuchungen an HeLa-Zellen über die Brauchbarkeit des 3-H-Desoxycytidins als spezifischer Vorläufer der Desoxyribonukleinsäure. Exptl. Cell Research 44, 627 (1966, c)
- MÜLLER, D. und R. RATHENBERG: Determination of desoxycytidine metabolism in HeLa-cell-cultures. In Vorbereitung.
- MÜLLER, D. und ROCKER, H.-E.: Untersuchungen zur Kinetik der Desoxycytidin-Inkorporation an HeLa-Zellen. In Vorbereitung.
- OEHLERT, W.: Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure-Synthese in den verschiedenen Strukturen der Zelle. Beitr.path.Anat. 124, 311 (1961)
- PAINTER, R.B. und R.M. DREW: Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell cultures (HeLa). Lab.Invest. 8, 278 (1959)
- PAINTER, R.B., R.M. DREW, and R.E. RASMUSSEN: Limitations in the use of carbon-labeled and tritium labeled thymidine in cell culture studies. Radiat.Res. 21, 355 (1964)
- PILGRIM, Ch.: Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdoppelung bei verschiedenen Zellarten von Maus und Ratte nach einer Doppelmarkierungsmethode. Vortrag auf dem 2. Europ. Anatomenkongreß in Brüssel, 1963. Anat.Anz. 115, 128 (1964)
- PILGRIM, Ch. und W. MAURER: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdoppelungszeit verschiedener Zellarten von Maus und Ratte bei Doppelmarkierung mit 3-H- und 14-C-Thymidin. Naturwissenschaften 49, 544 (1962).
- PLENTL, A.A., and R. SCHOENHEIMER: Studies on the metabolism of purines and pyrimidines by means of isotopic nitrogen. J.biol.Chem. 153, 203 (1944)

- QUASTLER, H., and F.G. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Exptl. Cell Research 17, 420 (1959)
- REICHARD, P.: The biosynthesis of deoxyribonucleic acid by the chick embryo. 1. Utilization of cytidine-C-14.
J.Biol.Chem. 234, 1244 (1959)
- REICHARD, P., and B. ESTBORN: Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides.
J.Biol.Chem. 188, 839 (1951)
- RIGAL, W.M.: Uptake and incorporation of tritiated thymidine in vitro culture.
Nature 192, 768 (1961)
- RUBINI, J.R., KELLER, S., EISENTRAUT, A., and E.P. CRONKITE: "In-vitro metabolism of 3-H-thymidine".
In: Tritium in physical and biol.Sciences II.
Int.At.En.Agency, Vienna 1962, S. 247.
- RUTMAN, R.J., A. CANTAROW, and K.E. PASCHKIS: Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C-14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma.
Cancer Res. 14, 119 (1954)
- SANDRITTER, W. und D. KLEINHANS: Über das Trockengewicht, den DNS- und Histonproteingehalt von menschlichen Tumoren.
Zschr.Krebsforsch. 66, 333 (1964)
- SANDRITTER, W., H.G.SCHIEMER, H. KRAUS und U. DÖRRIEN: Das Wachstum von Einzelzellen in der Gewebekultur. Interferenzmikroskopische Untersuchungen an HeLa-Zellen.
J.biophys.biochem.Cytol. 7, 579 (1960)
- SEEMAYER, N., R. HAAS und G. MAAS: Vergleichende autoradiographische Untersuchungen der Generationszeit, DNS-Synthesezeit und des Einbaues in die Chromosomen nach Markierung mit 3-H-5-Jod-2'-desoxyuridin und 3-H-Thymidin an Gewebekulturzellen.
Arch.Virusforsch. 18, 155 (1966)
- SCHACHTSCHABEL, D.O., H. LAZARUS, S. FARBER, and G.E. FOLEY: Sensitivity of cultured human lymphoblasts (CCRF-CEM cells) to inhibition by thymidine.
Exptl. Cell Research 43, 512 (1966)
- SCHMIDT, G.: Nucleases and enzymes attacking nucleic acid components. In: "The nucleic acids" I S. 555.
Hsg.: CHARGAFF, E., and J.N. DAVIDSON,
Ac.Press Inc., New York 1955.

- SCHNEIDER, G. und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung über den Einbau von H-3-Cytidin in die Kerne einiger Zellarten der Maus und über den Einfluß des Fixationsmittels auf die H-3-Aktivität. *Acta Histochem.* 15, 171 (1963)
- SCHNEIDER, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J.biol.Chem.* 161, 293 (1945)
- SCHNEIDER, W.C., and J. ROTHERHAM: Some studies of the metabolism of deoxycytidine-2-C-14 by hepatoma cells. *J.Biol.Chem.* 236, 2764 (1961)
- SCHULTZE, B., and W. OEHLERT: Autoradiographic investigations of incorporation of H-3-thymidine into cells of the rat and mouse. *Science* 131, 737 (1960)
- SCHULTZE, B., W. OEHLERT und W. MAURER: Über eine allgemeine Beziehung zwischen der Umsatzrate der Ribonukleinsäure und des Eiweisses im Organismus von Maus und Ratte. *Biochim.Biophys.Acta* 49, 35 (1961)
- STANNERS, C.P., and J.E. TILL: DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. *Biochim.Biophys.Acta* 37, 406 (1960)
- STEWART, P.A., H. QUASTLER, M.R. SKOUGAARD, D.R. WIMBER, M.F. WOLFSBERG, C.A. PERROTTA, B. FERBEL, and M. CARLOUGH: Four-factor model analysis of thymidine incorporation into mouse DNA and the mechanism of radiation effects. *Radiat.Res.* 24, 521 (1965)
- STÖCKER, E.: Autoradiographische Untersuchungen zur Deutung der funktionellen Kernschwellung am exokrinen Pankreas. *Z.Zellforsch.* 57, 47 (1962, a)
- STÖCKER, E.: Autoradiographische Untersuchungen zur Ribonukleinsäure- und Eiweiß-Synthese im nuklearen Funktionsformwechsel der exokrinen Pankreaszelle. *Z.Zellforsch.* 57, 145 (1962, b)
- STÖCKER, E., W. MAURER und H.-W. ALTMAN: Autoradiographische Untersuchungen der Eiweiß- und RNS-Synthese mit H-3-Leucin und H-3-Cytidin zur Deutung der funktionellen Kernschwellung während des Funktionswechsels im exokrinen Pankreas. *Klin.Wschr.* 39, 926 (1961)
- STONE, G.E., O.L. MILLER, and D.M. PRESCOTT: H³-Thymidine derivative pools in relation to macronuclear DNA synthesis in *tetrahymena pyriformis*. *J.of Cell Biol.* 25, 171 (1965)

- VENDRELY, R.: "The deoxyribonucleic acid content of the nucleus"
In: The nucleic acids II, 155. Hsg. E. CHARGAFF
and J.N. DAVIDSON. Ac.Press Inc., New York, 1955.
- WAERDEN, B.L., van der und E. NIEVERGELT: Tafeln zum Vergleich
zweier Stichproben mittels X-Test und Zeichen-
test.
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.
- WEGENER, K., S. HOLLWEG und W. MAURER: Autoradiographische Be-
stimmung der DNS-Verdopplungszeit und anderer
Teil-Phasen des Zell-Zyklus bei fetalen Zellar-
ten der Ratte.
Z.Zellforsch. 63, 309 (1964)
- WEISSMAN, S.M., R.M.S. SMELLIE, and J. PAUL: Studies on the
biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts
of mammalian cells. IV. The phosphorylation of
thymidine.
Biochim.Biophys.Acta 45, 101 (1960)
- WIMBER, D.E., and H. QUASTLER: A 14-C- and 3-H-thymidine double
labeling technique in the study of cell prolifera-
tion in tradescantia root tips.
Exptl. Cell Research 30, 8 (1963)
- WIMBER, D.E., H. QUASTLER, O.L. STEIN, and D.R. WIMBER: Analy-
sis of tritium incorporation into individual
cells by autoradiography of squash preparations.
J.biophys.biochem.Cytol. 8, 327 (1960)
- WOODS, P.S., and J.H. TAYLOR: Studies of ribonucleic acid meta-
bolism with tritium labelled cytidine.
Lab.Invest. 8, 309 (1959)
- ZAJICEK, G., N. BERNSTEIN, A. ROSIN, and J. GROSS: Studies on
the in vitro incorporation of tritiated thymi-
dine into ascites tumor cells.
Exptl. Cell Research 31, 390 (1963)
- ZAJICEK, G., A. ROSIN, and J. GROSS: "Tritiated thymidine as
tracer in DNA metabolism and cell dynamics of
experimental myeloid leukaemia". In: Tritium
in physical and biological Science II,
Int.At.En.Agency, Vienna, 1962, S. 291.

